

**OBTENCION, IDENTIFICACION Y DETERMINACION DEL PODER
ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS
PRESENTES EN LA SEMILLA DE *Bixa orellana* AMARILLA (ACHIOTE)**

ANNIE ELISABETH ARGÜELLO HURTADO



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE QUÍMICA PURA Y APLICADA
Santiago de Cali, 2014**

**OBTENCION, IDENTIFICACION Y DETERMINACION DEL PODER
ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS
PRESENTES EN LA SEMILLA DE *Bixa orellana* AMARILLA (ACHIOTE)**

ANNIE ELISABETH ARGÜELLO HURTADO

**Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al
Título de Química.**

Director: Jaime Restrepo Osorio, Ph. D.

Codirectora: Ana Julia Colmenares de Vélez, Ph. D.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE QUÍMICA PURA Y APLICADA
Santiago de Cali, 2014**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE QUÍMICA PURA Y APLICADA
SANTIAGO DE CALI
2014

Annie Elisabeth Argüello Hurtado, 1987

**OBTENCION, IDENTIFICACION Y DETERMINACION DEL PODER
ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS
PRESENTES EN LA SEMILLA DE *Bixa orellana* AMARILLA (ACHIOTE)**

Palabras clave:

Bixa orellana, Achiote, fluidos supercríticos, Carotenoides, bixina.

NOTA DE APROBACIÓN

El trabajo de grado titulado **OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA SEMILLA DE *Bixa orellana* AMARILLA (ACHIOTE)** presentado por el estudiante Annie Elisabeth Argüello Hurtado código: 0525003. Bajo la dirección del Dr. Jaime Restrepo Osorio

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN:

- ☐ APROBADO
- ☐ RECOMENDACIÓN DE DISTINCIÓN DE MERITORIO
- ☐ RECOMENDACIÓN DE DISTINCIÓN DE LAUREADO
- ☐ REPROBADO

Jaime Restrepo Osorio, Ph.D

Jurado

DEDICATORIA

A mi familia, con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita bondad y misericordia

A la Universidad del Valle por acogerme tanto

Al profesor Jaime Restrepo por sus valiosas enseñanzas, por confiar en mí y ayudarme siempre

Al grupo GIPNA por recibirme y aceptarme

A los profesores del grupo GIPNA por todas sus enseñanzas y colaboración

A todos los profesores que me enseñaron durante mi carrera

A mis padres y hermano

A José por ser mi motivo y mi luz

A los compañeros del grupo GIPNA

A mis amigos por su apoyo, paciencia y motivación a Paola, Leidy, Dayanna, Karen, Diego.

A Yaneth Guevara y a todo el grupo del Laboratorio de Análisis Industriales, por acogerme y ayudarme.

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TRABAJO DE GRADO Y/O TESIS Y/O MONOGRAFIA EN LA PAGINA WEB DE LA DIVISIÓN DE BIBLIOTECAS O CUALQUIER OTRA BASE DE DATOS (INTERNET) QUE LA BIBLIOTECA O UNIVERSIDAD DEL VALLE DISPONGA PARA ELLO.

Yo, Annie Elisabeth Argüello Hurtado, mayor de edad, identificada con cédula de ciudadanía 1107046710 de Cali, autor de OBTENCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PODER ANTIOXIDANTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS PRESENTES EN LA SEMILLA DE Bixa orellana AMARILLA (ACHIOTE) autorizo para que esta sea puesta (texto completo) en la página web de la División de Bibliotecas de la Universidad del Valle o cualquier otra base de datos que la universidad disponga para ello. Expido esta autorización bajo el entendido que no recibiré ninguna contraprestación económica, en tanto que se busca divulgar conocimientos académicos sin ningún interés comercial. En constancia de lo expuesto se firma a los 12 días del mes de septiembre de 2014

ANNIE E. ARGUELLO
C.C 1107046710 de Cali

INDICE

	Pág
RESUMEN	1
0. INTRODUCCIÓN	2
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	4
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo general	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES	7
3.1 Generalidades de la familia <i>Bixaceae</i>	7
3.2 <i>Bixa orellana</i>	7
3.2.1 Descripción botánica y morfológica de la especie	8
3.2.2 Composición de las semillas	9
3.2.3 Usos	11
3.3 Extracción	12
3.3.1 Métodos convencionales	13
3.3.2 Extracción con Fluidos Supercríticos	14
3.4. Identificación de metabolitos secundarios	16
3.4.1 Carotenoides	17
3.4.1.1 Clasificación	17
3.4.1.2. Bixina	18
3.4.1.3 Norbixina	19
3.4.2 Flavonoides	19
3.5. Antioxidantes	21
3.5.1 Metabolitos de <i>Bixa orellana</i> con poder antioxidante	22

4. METODOLOGÍA	23
4.1 Procedimientos generales	23
4.2 Recolección del material vegetal	23
4.3 Extracción Supercrítica	24
4.3.1 Condiciones experimentales	24
4.3.2 Equipo de extracción	25
4.4 Separación de compuestos apolares libres de bixina a partir de un extracto de Fluidos Supercríticos	26
4.5 Extracción y separación de bixina por Ultrasonido	27
4.6 Extracción de metabolitos por Ultrasonido usando hexano	27
4.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	28
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	29
5.1 Resultados de la extracción por Fluidos supercríticos	29
5.1.1 Identificación de metabolitos a partir del extracto de Fluidos Supercríticos.	33
5.1.2 Obtención de compuestos apolares libres de bixina a partir del extracto de Fluidos Supercríticos	38
5.2 Resultados de la extracción y separación de bixina por Ultrasonido	41
5.2.1 Identificación de bixina por EM-APCI	41
5.2.2 Identificación de bixina por RMN- ¹ H	43
5.3 Resultados de la obtención de compuestos por ultrasonido usando Hexano	45
5.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales Obtenidos usando el método del DPPH	47
6. CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

INDICE DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Flores de <i>Bixa orellana</i>	8
Figura 2. Fruto de <i>Bixa orellana</i>	9
Figura 3. Planta de <i>Bixa orellana</i>	9
Figura 4. Estructura química de la bixina	10
Figura 5. Esquema de las partes que componen un equipo de FSC	14
Figura 6. Estructura química del Isopreno (2-metil 1,3 Butadieno)	17
Figura 7. Estructura química del β -Caroteno	18
Figura 8. Estructura química de la norbixina	19
Figura 9. Estructura básica de los flavonoides	19
Figura 10. Estructura química de la quercetina	20
Figura 11. Esquema del equipo de extracción SC utilizado	26
Figura 12. Cartucho para la extracción en fase sólida	27
Figura 13. Perfil de HPLC del extracto oleoso obtenido por FSC	33
Figura 14. Apariencia del extracto obtenido por FSC	34

Figura 15.	Espectro UV-Vis del extracto por fluidos supercríticos	34
Figura 16.	Perfil de CG-EM del extracto oleoso obtenido por FSC.	35
Figura 17.	Espectro de masas por impacto electrónico (IE) del pico 36	35
Figura 18.	Espectro de masas obtenido de la base de datos NIST para <i>trans</i> -geranilgeraniol.	36
Figura 19.	Espectro de masas por IE del pico 5	37
Figura 20.	Espectro de masas obtenido de la base de datos NIST para α -guaieno	37
Figura 21.	Placas cromatográficas de los extractos de fluidos supercríticos fase móvil Hexano: Acetona (8:2)	38
Figura 22.	Perfil de CG correspondiente a la fracción 1	39
Figura 23.	Espectro de masas por IE del pico 4 de la fracción 1	39
Figura 24.	Perfil de CG correspondiente a la fracción 2	40
Figura 25.	Espectro de masas por IE del pico 14 de la fracción 2	40
Figura 26.	Apariencia del compuesto obtenido a partir de ultrasonido y extracción líquido-líquido	41
Figura 27.	Espectro de masas por APCI modo positivo	42
Figura 28.	Espectro de masas por APCI modo negativo	43

Figura 29. Espectro de RMN- ¹ H de bixina aislada	44
Figura 30. Perfil de CG correspondiente a la fracción 1 del extracto oleoso obtenido	46
Figura 31. Estructura química del Alloaromadendreno	46
Figura 32. Espectro de masas por IE correspondiente al pico 2	47

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Composición porcentual de las semillas de la especie <i>Bixa orellana</i>	10
Tabla 2. Nombres y estructuras de algunos Carotenoides minoritarios aislados a partir de la semilla de <i>Bixa orellana</i>	11
Tabla 3. Estructura de algunos flavonoides y su clasificación	21
Tabla 4. Orden y condiciones experimentales analizando el tamaño de la muestra en la extracción del extracto oleoso de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	24
Tabla 5. Orden y condiciones experimentales analizando la presencia de co-solvente en la extracción del extracto oleoso de las semillas de <i>Bixa orellana</i>	25
Tabla 6. Esquema de distribución de las soluciones en la placa para DPPH	28
Tabla 7. Resultados de la extracción por FSC analizando la influencia de La forma física de las semillas.	29
Tabla 8. Resultados de la extracción por FSC analizando la influencia de la presencia de co-solvente	29

Tabla 9. Resultados del análisis ANOVA para primer y segundo experimento	30
Tabla 10. Estructura de los compuestos mayoritarios identificados en el extracto oleoso de achiote	37
Tabla 11. Algunas posibles fragmentaciones de uno de los compuestos identificados en el extracto oleoso de achiote	38
Tabla 12. Comparación de desplazamientos químicos entre los dos isómeros de bixina y el compuesto aislado	45
Tabla 13. Valores de IC_{50} obtenidos con el método de DPPH para Vit _c , Q _c , M _{FSC} y M _{US}	48

LISTADO DE ABREVIATURAS

APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
CC	Cromatografía de columna
CCF	Cromatografía de capa fina
CG	Cromatografía de gases
DPPH	difenil-(2,4,6-trinitrofenil) iminoazanium
EM	Espectrometría de masas
ESC	extracción supercrítica
FSC	Fluidos supercríticos
GIPNA	Grupo de Investigación en Productos Naturales y Alimentos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IE	Impacto Electrónico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV-vis	Ultravioleta visible
VIT _C	Vitamina C
Q _C	Quercetina

RESUMEN

A partir de extractos metanólicos de semillas de la especie *Bixa orellana* amarilla, se separaron e identificaron tentativamente algunos metabolitos secundarios: diterpenos (*trans*-geranilgeraniol, *cis*-geranilgeraniol, 3,7,11,15-tetrametilhexadeca-1,6,10,11-tetraen-3-ol) y sesquiterpenos (α -Guaieno, Alloaromadendreno). La elucidación estructural de estos metabolitos se realizó usando técnicas espectroscópicas y por comparación con los datos reportados en la literatura.

Se obtuvieron aceites esenciales por dos métodos de extracción: fluidos supercríticos (FSC), y ultrasonido, de semilla amarilla cultivada con porcentajes de recuperación de 6.04% y 2.50% respectivamente. Su determinación se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM mediante comparación de los índices de retención y espectros de masa con los datos reportados en la literatura.

Se logró la extracción y separación del apocarotenoide bixina con un porcentaje de recuperación del 1.5% y su identificación por RMN- ^1H con desplazamientos característicos 7,71 (dd, 2H, H-8, H-8'), 5,90 (t, 2H H-7, H-7'), 3,79 (s, 3H, COOCH₃), 1,99 (s, 6H, H-20, H-20').

Por EM-APCI se observaron picos para el modo positivo $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 395, $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 377), $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$ (m/z 363), $[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO})]^+$ (m/z 335) y $[\text{M} + \text{H} - (\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} + \text{H}_2\text{O})]^+$ (m/z 317). Y para el modo negativo $[\text{M} - \text{H}]^+$ a m/z 393 y pérdidas de CH₃OH a (m/z 361), COO $^\cdot$ (m/z 349) y CH₃OH + COO $^\cdot$ (m/z 317).

Se evaluó la actividad antioxidante contra vitamina C y Quercetina, de la muestra oleosa obtenida tanto por fluidos supercríticos como por ultrasonido usando DPPH 132ppm encontrando un IC₅₀ 242,29 ppm \pm 7,47ppm para la muestra de FSC y un valor nulo para la muestra obtenida por ultrasonido.

0. INTRODUCCION

Bixa orellana es un árbol de aspecto robusto nativo de las selvas de Brasil y perteneciente a la familia *Bixaceae*. Esta especie, ha sido ampliamente estudiada desde los años 80's (principalmente sus semillas) debido al gran contenido del colorante bixina, un apocarotenoide que le confiere un elevado poder tintóreo apto para usarse como aditivo alimenticio debido a que es un colorante natural con propiedades antioxidantes siendo, por lo tanto, además de inocuo, benéfico para la salud (Murcillo, 2009)

En la actualidad se han llevado a cabo diversas investigaciones enfocadas en determinar las propiedades biológicas y médicas no sólo de este apocarotenoide, sino de gran cantidad de metabolitos secundarios presentes tanto en las semillas como en la raíz y hojas de esta especie. Lo anterior, tiene como propósito sustentar mediante análisis científico las propiedades que desde tiempos ancestrales se le han conferido a esta especie para justificar los diversos usos entre los que se encuentran: repelente, protector solar, antiparasitario, entre muchos otros. (Córdoba, 1987). De esta manera, se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides entre otros (Clocker, 2007) con amplias propiedades entre las que resaltan el poder antioxidante y antibacterial.

La presencia de estos compuestos se ha determinado por diversos métodos como son las técnicas de separación como la cromatografía líquida (HPLC) y cromatografía gaseosa (CG), siendo la extracción de los mismos un factor determinante para lograr la obtención de productos con alta pureza y estabilidad. El colorante del achiote se puede obtener por diversos métodos, en donde la extracción por solventes es la forma más usual; sin embargo, las altas temperaturas utilizadas y la presencia de residuos de solventes son factores que afectan la inocuidad de los productos. Por esta razón se ha implementado un método alternativo para la extracción de dichos metabolitos. Este método emplea un fluido supercrítico a temperaturas y presiones que no

afectan la estructura química y estabilidad de los metabolitos presentes en la especie.

Para la extracción del colorante del achiote el fluido más utilizado es el CO₂ supercrítico debido a que es una gas inerte, económico, no inflamable, no tóxico y por ende apto para garantizar la conservación del extracto. Además algunos reportes indican la adición de una pequeña cantidad de solvente orgánico durante el proceso de extracción con lo que se logra un mayor rendimiento de extracción. (Nobre, 2002)

En el presente proyecto se diseñó una metodología para mejorar el rendimiento en la extracción del aceite de la especie *Bixa orellana* mediante la técnica de fluidos supercríticos, usando dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) y metanol (MeOH) como co-solvente. Paralelamente, se desarrollaron otros métodos de extracción (extracción con solventes) con el propósito de obtener otro perfil de metabolitos. Posteriormente, usando técnicas espectroscópicas se elucidaron algunos metabolitos mayoritarios para dar así un respaldo científico a las amplias propiedades que le confieren a esta semilla.

Con todo lo anterior se busca impulsar el cultivo de esta especie en nuestra región para su uso en diversas áreas como lo son la industria de alimentos, la textil y la cosmética puesto que es un colorante natural, con propiedades antioxidantes y gran estabilidad; a la vez de contribuir al aprovechamiento de nuestra riqueza natural para mejorar nuestra calidad de vida y por ende aportar al desarrollo de nuestro país.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El ataque constante al que han estado sometidos los colorantes sintéticos, debido a que en muchos de ellos se ha encontrado actividad cancerígena, lo que ha provocado prohibiciones por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para varios de estos, nos invita a la investigación y aprovechamiento de nuestra riqueza vegetal haciendo uso de la ciencia para la obtención de productos que poseemos pero que hace muy poco estamos comenzando a explorar. La exploración de nuestra riqueza natural puede abrirnos camino hacia nuevos compuestos químicos como: colorantes, plaguicidas no contaminantes y medicamentos; productos que hoy debemos importar. Con el aprovechamiento de esta riqueza contribuiríamos a mejorar la economía de nuestro país a la vez de asegurar una mejor calidad de vida.

La semilla de la especie *Bixa orellana*, ha sido usada desde tiempos ancestrales gracias a sus numerosas propiedades, entre las cuales se encuentran: antitumoral, antiinflamatoria, astringente, emoliente, antiséptica, antibacteriana, antioxidante, cicatrizante entre otras y se ha indicado en el tratamiento de infecciones bacterianas de forma general, estomatitis, y en la curación de heridas y quemaduras (Lourido, 2010). Debido a la amplia gama de propiedades de esta especie el grupo de investigación en productos naturales y alimentos de la Universidad del Valle (GIPNA) se ha propuesto elucidar algunos de los metabolitos secundarios presentes para dar un respaldo científico a las cualidades que se le asocian a esta semilla, logrando hasta la actualidad la extracción de varios de estos. (Meñaca, 2010), (Rodríguez, 2010). Ahora es de su interés mejorar el proceso de extracción con el fin de facilitar el estudio adecuado de estos metabolitos, a la vez de garantizar la inocuidad de los productos aislados contribuyendo al desarrollo científico y a la implementación de los mismos en diversas áreas como la medicina, la industria textil y la alimenticia. Lo anterior, es una propiedad de sumo interés debido a que es un colorante natural con propiedades antioxidantes lo que conduciría a un ahorro en ingredientes en la industria de alimentos. Con base a lo anterior, este proyecto estará orientado en la evaluación del rendimiento de extracción

del colorante de la semilla de la especie *Bixa orellana* amarilla, el estudio estará centrado en esta especie pues no se conoce mucho de la misma en la literatura, además porque es propósito del grupo de investigación realizar una comparación entre la composición de ésta especie respecto a la especie *Bixa orellana* roja, con el propósito de promover en la región el cultivo de la especie más conveniente, apoyado en la productividad de sus semillas basando esta decisión con un acontecimiento de tipo científico. En este proyecto se empleará una metodología que permita la obtención de los metabolitos secundarios mayoritarios de la especie *Bixa orellana* amarilla, con un rendimiento superior al obtenido en previos trabajos de investigación para su posterior identificación y determinación de su capacidad antioxidante. Estos resultados permitirán conservar y dar un respaldo con la metodología que la comunidad científica exige a la enormes y sorprendentes cualidades de esta semilla.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio científico de la semilla de la especie *Bixa orellana* amarilla mediante la detección e identificación de algunos metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el rendimiento del extracto de la semilla de la especie *Bixa orellana* amarilla mediante la técnica de Fluidos Supercríticos.
2. Separar, por medio de cromatografía de columna y HPLC, los metabolitos presentes en la semilla de la especie *Bixa orellana* amarilla.
3. Identificar al menos un metabolito de mayor proporción mediante la técnica CG-EM.
4. Determinar el poder antioxidante del extracto obtenido haciendo uso del radical sintético DPPH.

3. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de la familia *Bixaceae*

Se conoce la familia *Bixaceae* desde 1822 cuando fue descrita por Heinrich Friedrich situándola como una familia de plantas dicotiledóneas del orden de las violales. Aunque en la actualidad hace parte del orden de las Malvales debido a las características de sus flores. La familia *Bixaceae* incluye tres géneros con 25 especies. Esta familia la componen hierbas, árboles y arbustos. Sus plantas son hermafroditas y todas las especies tienen cinco sépalos. El género más representativo es el género *Bixa*, de gran importancia económica debido a sus aplicaciones en la industria textil y condimentaria; así, como a nivel medicinal. Este es el caso de la semilla de la especie *Bixa orellana* (Achiote) cuyo color rojo se usa como aditivo colorante de quesos, mantequillas margarinas y en la industria textil para teñir telas de algodón. También se ha usado el extracto acuoso de la raíz de *Bixa orellana* en ensayos “*in vivo*” en ratones encontrando una actividad depresora del sistema nervioso central. (Idárraga, 2011)

El género *Bixa* se compone de 5 especies: *B. orellana*, *B. shoporrocarpa*, *B. upatensis*, *B. platicarpa*, *B. azara*, (Stevens, 2001) siendo *Bixa orellana* la más conocida agrícola y comercialmente así como, la más estudiada en cuanto a la variedad de sus componentes encontrando diversas actividades biológicas, medicinales etc, que sustentan sus usos etnobotánicos.

3.2 *Bixa orellana*

La *Bixa orellana* conocida también bajo los nombres de annatto, achiote, achote, onnote, bija, bixa, urucú entre muchos otros, es una especie de planta arborescente de las regiones intertropicales de América cultivada principalmente desde Brasil y Bolivia hasta México en épocas precolombinas y hasta la actualidad (Lourido, 2010). Hoy por hoy su cultivo se ha extendido ampliamente en los trópicos de África y Asia, hasta la India, Filipinas e islas de

Hawái, aunque la mayor producción se concentra en América Latina y el Caribe: Perú, Ecuador, Colombia, República Dominicana y Jamaica.

Colombia cuenta con las mejores condiciones ecológicas para el cultivo de esta especie, especialmente en los departamentos del Valle del Cauca, Chocó, Nariño y Cauca y en las regiones de clima cálido y precipitación anual no inferior a los 1800mm (Meñaca, 2010)

3.2.1 Descripción botánica y morfológica de la especie

La planta de achiote es un arbusto de aspecto robusto de rápido crecimiento que alcanza de cuatro a seis metros de altura. Sus hojas son simples, grandes, verdosas claras, de márgenes lisos. Las flores son grandes vistosas de sexualidad hermafrodita dispuestas en ramilletes, y pueden ser blancas o rosadas dependiendo la variedad. (Ver figura 1).



Figura 1. Flores de *Bixa orellana*: izq. Variedad rosada. Der. Variedad blanca ^a

El fruto consiste en una cápsula roja de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, y colores que van desde verde oscuro a morado (según las variedades), y que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. Cada cápsula contiene entre 10 y 50 semillas cantidad que varía en relación con el tamaño de la misma, las cuales miden entre 3 y 5 mm de largo, y tiene forma cónica o piramidal. Las semillas son de color rojo o anaranjado y están cubiertas por una fina membrana carnosa de color rojo que contiene el colorante (ver figura 2)



Figura 2. Fruto de *Bixa-orellana*^a

La clasificación taxonómica de la planta se muestra a continuación:

- Reino: *Plantae*
- Sub.reino: *Tracheobionta*
- Division: *Magnoliofita*
- Super-división: *Espermatofita*
- Sub-división: *Angioesperma*
- Clase: *Magnoliopsida*
(dicotiledónea)
- Sub-clase: *Dillenidae*
- Orden: *Malvales*
- Familia: *Bixáceae*
- Género: *Bixa*
- Especie: *B. orellana* Linneo



Figura 3. Planta de *Bixa orellana*^a

3.2.2 Composición de las semillas

La composición porcentual de la semilla se muestra en la tabla 1.

El colorante obtenido de la misma contiene como compuesto mayoritario el diapocarotenoide 9-cis-bixina, (Tocchini, 2001). Este compuesto es un mono metil éster y es el encargado de transferir el color rojo presente en la superficie de las semillas. (Ver figura 4). La biosíntesis de este compuesto, (Florence, 2003) es iniciada a partir del precursor licopeno y mediada por tres

enzimas en una reacción secuencial, lo que implica la presencia de subproductos y/o productos de degradación.

Tabla 1. Composición porcentual de las semillas de la especie *Bixa orellana* L.

COMPONENTE	CONTENIDO (%)
Celulosa	40-45
Sucrosa	0.3-0.9
Aceite esencial	3.0
Carbohidratos	39-45
Almidones	11-13
Pigmentos	4.5-5.5
Proteínas	13-16
Cenizas	4.5-7.9

Algunos metabolitos secundarios de *Bixa orellana* fueron aislados por Mercadante y colaboradores, sus nombres y estructuras se muestran en la tabla 2. (Mercadante, 1997). Debido al sistema de dobles enlaces conjugados, éstos compuestos poseen una actividad antioxidante que marca su reactividad la cual es promovida por agentes como la luz, el aire, la temperatura etc. factores que favorecen la formación de productos de degradación como tolueno, ácido tolúico, m-xileno, entre otros, nocivos para la salud por lo que se hace indispensable desarrollar técnicas de extracción que garanticen la inocuidad de los productos (Jaramillo, 1992).

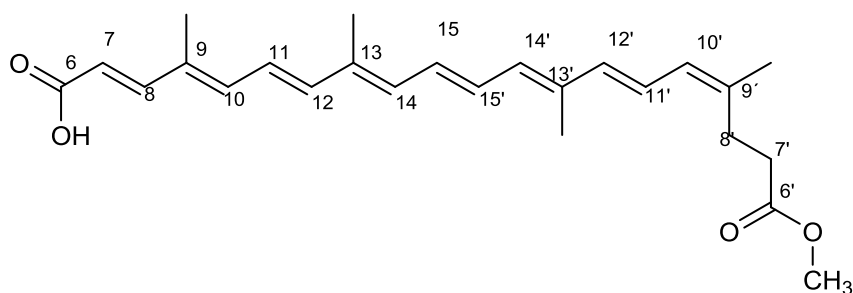


Figura 4. Estructura química de la bixina

Tabla 2. Nombres y estructuras de algunos Carotenoides minoritarios aislados a partir de la semilla de *Bixa-orellana* L.

COMPUESTO	ESTRUCTURA
Dimetil (9Z,9'Z)-6,6'-diapocaroten-6,6'-dioato	
Metil bixina (dimetil (9Z)-6,6'-diapocaroten-6,6'-dioato)	
Metil (9Z)-8'-oxo-6,8'-diapocaroten-6-oato	
Metil (9Z)-10'-oxo-6,10'-diapocaroten-6-oato	
Metil (9Z)-6'-oxo-6,5'-diapocaroten-6-oato	
Metil (9Z)-6'-oxo-6,6'-diapocaroten-6-oato	

3.2.3 Usos

El principal uso del pigmento obtenido a partir de la especie *Bixa orellana* es el de aditivo de color en la industria de alimentos y bebidas; Esto debido a su resistencia a la acción de agentes químicos y a la nula toxicidad reconocida por la OMS (annatto N°. E160b). (Lourido, 2010) lo que hace de esta semilla inofensiva para el organismo humano permitiendo la aplicación de este pigmento en la coloración de quesos, margarina, dulces, bebidas refrescantes y aun como especia en la cocina por sus poder tintóreo similar al del azafrán (*Crocus sativus* L.).

En la actualidad, a esta especie se le asocian gran cantidad de aplicaciones como antidiarreico, antiemético, cicatrizante, antihipertensivo, cardiotónico, diurético, repelente de insectos, antipirético, depurativo, digestivo, expectorante, sedante, antiséptico vaginal, y para la lepra, hepatitis, quemaduras, acarosis (caracha) y amigdalitis, entre otros.

Investigaciones realizadas probaron la acción cicatrizante de un extracto alcohólico de la especie en piel dañada de conejos. (Gonzales, 1989)

La acción antioxidante fue comprobada estudiando el efecto de la norbixina en la respuesta al daño del ADN en células de *Escherichia Coli*. (Junior, 2005)

Otro reporte (Fleischer, 2003) demostró la acción antimicrobiana de la especie sobre gérmenes gram positivos.

También se han reportado efectos hipoglicemiantes, hipotensores (Rodríguez , 1988) y antimaláricos para extractos de *Bixa orellana*. (Vonthron, 2003).

Otros estudios describen las potencialidades de la *Bixa orellana* para prevenir mutaciones que conducen al cáncer junto a propóleos y hongos comestibles. (Agner , 2005).

Además, existe un reporte que muestra el potencial de la especie como revelador de placa dentobacteriana. El estudio fue realizado en perros de raza Beagle encontrando resultados muy similares a la tinción lograda con el revelador convencional (PLACDENT). (Gutiérrez, 2005).

3.3 Extracción

La extracción del colorante del achiote se logra por diversos métodos siendo los más utilizados en los últimos años la extracción por solventes y la extracción por fluidos supercríticos (FSC). En el primer método se utilizan una amplia gama de solventes desde Hexano hasta agua, obteniendo mayoritariamente el carotenoide bixina con el uso de solventes apolares o de baja polaridad, mientras que con solventes polares se favorece la obtención de

norbixina. En la extracción con FSC se obtiene un extracto con polaridad acorde a la del fluido supercrítico utilizado. Sin embargo, con el propósito de extender el rango de polaridad del colorante obtenido se utiliza un agente modificador, el cual consiste en un solvente generalmente orgánico que se adiciona al FSC en proporciones que no superan el 5%.

3.3.1 Métodos convencionales

Dentro de los métodos convencionales utilizados a nivel industrial el más común es la extracción con álcali acuoso, en la cual se aprovechan las propiedades ácidas de la bixina para la formación de la sal correspondiente soluble en agua. (Mosquera, 1989) y (Jaramillo, 1992) Las semillas se lavan con solución alcalina con concentraciones que varían entre el 0.5 y 2% P/V. El extracto y el lavado se acumulan y la solución roja oscura se neutraliza con un exceso de ácido mineral, el cual precipita el pigmento. Luego se filtra, se lava y el líquido sobrante se separa hasta obtener la masa colorante para secar.

Este es un método sencillo pero posee la desventaja de la gran cantidad de solvente que se utiliza para el proceso de extracción, además que los productos obtenidos presentan pequeñas concentraciones de solvente haciendo del colorante una sustancia nociva para la salud. También las altas temperaturas (mayores a 100°C) que se requieren para el proceso conllevan a la formación de diversos productos de degradación no deseados. (Mendes, 2003)

Otro reporte (Jaramillo, 1992) describe la extracción con aceites vegetales; método que consiste en una extracción en caliente durante largas horas obteniendo una suspensión con alto contenido del colorante, pero con posibles productos de degradación dado las altas temperaturas aplicadas para el proceso. En este reporte se comprobó que por encima de los 60°C la bixina es degradada lo que disminuye el rendimiento del proceso.

Por lo anterior, la extracción con solventes supercríticos es una buena alternativa con el fin de evitar estos inconvenientes.

3.3.2 Extracción con Fluidos Supercríticos

La extracción con fluidos supercríticos es una separación tecnológica que utiliza un fluido supercrítico como solvente. Una sustancia es considerada un fluido supercrítico cuando está por encima de su presión y temperatura críticas. Para realizar una extracción supercrítica se requiere un mecanismo de presurización que lleva el fluido que va a actuar como solvente supercrítico hasta la presión supercrítica, esto se logra en una bomba de alta presión (ver figura 5). Un sistema de suministro de calor que caliente el fluido presurizado por encima de su temperatura crítica, una celda de extracción en la cual se pone en contacto el fluido supercrítico y la matriz y por último un sistema de recolección que cuenta con una zona donde se produce la descompresión del fluido y una o varias celdas para la colección del analito.

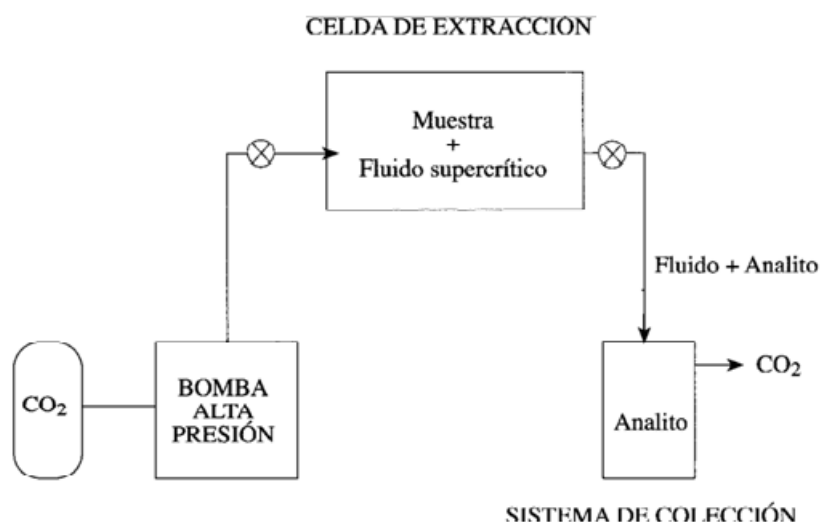


Figura 5. Esquema de las partes que componen un equipo de FSC

Esta técnica de extracción se viene utilizando con gran auge desde hace unos 10 años siendo muy llamativa porque ofrece mayores rendimientos y una mejor calidad del producto en un tiempo mucho menor con relación al requerido en los métodos convencionales de extracción. Además el gran atractivo que presentan los fluidos supercríticos para ser utilizados como agentes de extracción radica en que poseen densidades similares a las de los líquidos, y por tanto similares propiedades disolventes, pero a la vez su viscosidad es

mucho menor, lo que hace que los coeficientes de difusión de los solutos en un fluido supercrítico sean mucho mayores que en un disolvente líquido.

Otra importante propiedad de los fluidos supercríticos es que su densidad está estrechamente relacionada con la presión y en menor medida con la temperatura. (Valverde, 1995).

Dentro de los fluidos supercríticos más utilizados se encuentran el CO₂ y el N₂O puesto que alcanzan el estado supercrítico a temperaturas y presiones relativamente moderadas. Diversos estudios e investigaciones han mostrado la eficiencia y ventajas de estos procesos de extracción usando CO₂ como solvente supercrítico (Sahena, 2009). La tendencia a utilizar dicho solvente se debe a que tiene la propiedad de ser gas a temperatura ambiente, es económico, no inflamable, inerte, no tóxico y adquiere el estado supercrítico a baja temperatura (31°C) y a una presión de fácil manejo (73 atm).

Una desventaja que presenta este fluido es su carácter apolar lo que lo hace inadecuado para la extracción de analitos de elevada polaridad. Sin embargo, esta dificultad es usualmente superada por la adición de un co-solvente; un solvente orgánico de mayor polaridad con el cual se consigue que las extracciones lleguen a ser completas.

Un estudio reciente demostró una mejor retención de compuestos aromáticos y un mayor rendimiento de extracción para una presión de 10.3 MPa y temperatura de 50°C. (Norulaini, 2009)

(Silva, 2008) encontraron que la presencia de aceite en las semillas de *Bixa orellana* actúa como un co-solvente para la extracción con fluidos supercríticos usando CO₂ incrementando la solubilidad.

(Palenzuela, 2004) aplicó la ESC en el aislamiento de compuestos polifenólicos a partir de uva usando CO₂ supercrítico con metanol como modificador alcanzando una rápida extracción bajo condiciones relativamente suaves.

En un trabajo previo del GIPNA, (Gómez, 2004) encontró que las condiciones para las cuales se obtiene mayor rendimiento de extracción son 3000 psi y una temperatura de 60°C.

3.4 Identificación de metabolitos secundarios

Con el propósito de identificar los diferentes componentes del extracto obtenido del achiote, se han realizado análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), así como cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores de espectrometría de masas (HPLC-EM)

Con este acople se logra la separación de los componentes presentes en el extracto, trabajo realizado por la cromatografía de gases, y además la identificación de cada componente (espectrometría de masas). Diversos reportes pueden citarse sobre la detección, identificación y caracterización de los componentes presentes en las semillas de la especie *Bixa orellana* encontrándose como principales metabolitos los carotenoides y los flavonoides.

(Campos, 2011), identificaron y cuantificaron por medio de HPLC acoplada a detectores de arreglo de diodos y espectrometría de masas, la bixina y un derivado del ácido caféico como los principales compuestos fenólicos presentes en la semilla del achiote.

(Ramamoorthy, 2010), identificaron y caracterizaron funcionalmente mediante cromatografía de gases (CG) 3 genes que codifican para la biosíntesis de la bixina y que están presentes no solo en *Bixa orellana* sino también en *Crocus sativus* (azafran) y *Vitis vinífera* (uva).

Otro estudio aplicó espectrometría de masas mediante la técnica TOF-SIMS usando silicona como sustrato para determinar algunos de los constituyentes del achiote encontrando picos moleculares relacionados con la bixina. (Houssiau L., et al., 2004)

(Mercadante, 1997), aislaron mediante cromatografía (CC, CCF, HPLC) y elucidaron haciendo uso de espectroscopia (UV-VIS, EM, RMN) la estructura de seis Carotenoides menores de achiote.

(Scotter, 1995), aisló y purificó el principal producto de degradación térmica de la 9'-*cis*-bixina, éster *trans*-monometil del ácido 4,8-dimetiltetradecahexaenodiico confirmando su estructura mediante HPLC, EM y RMN.

3.4.1 Carotenoides

Los carotenoides o tetraterpenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). En los carotenoides ocho unidades de isopreno (Ver figura 6) se unen covalentemente “cabeza”-“cola” para formar un sistema altamente conjugado. El sistema de dobles enlaces conjugados determina las propiedades de absorción de luz y reactividad química confiriendo una amplia gama de propiedades a estos compuestos.

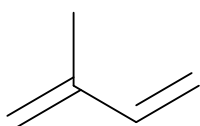


Figura 6. Estructura química del Isopreno (2-metil 1,3 Butadieno)

3.4.1.1 Clasificación

Esta familia de compuestos se clasifica de dos formas diferentes de acuerdo a su estructura química y a su funcionalidad. Conforme a su estructura química se clasifican como carotenos si solo contienen carbono e hidrogeno, tal es el caso del Beta-caroteno, el más abundante y común de los carotenoides (ver figura 7) o son considerados como xantofilas si además de carbono e hidrogeno poseen oxígeno en su cadena. Ejemplos de xantofilas son la luteína y la astaxantina. Acorde a su funcionalidad en plantas se clasifican como primarios si son necesarios para los procesos fotosintéticos mientras que si no son fundamentales para la supervivencia de la planta se clasifican como secundarios.

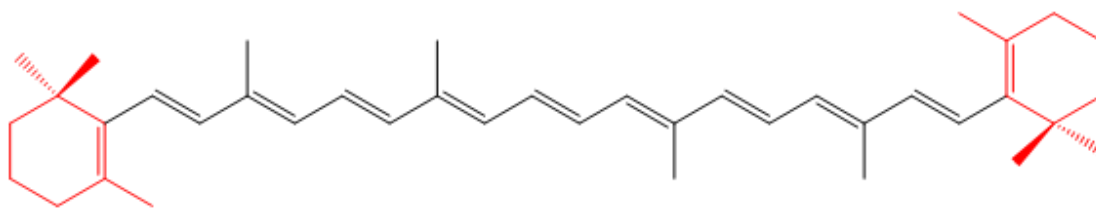


Figura 7. Estructura química del β -Caroteno, en rojo se marcan los anillos β -ionona.

La principal función de los carotenoides está relacionada a procesos fotosintéticos actuando como detectores de luz y como antioxidantes. En la industria de alimentos tienen aplicaciones como colorantes naturales. Variados reportes confirman estas aplicaciones (Kiokias, 2003), (Maoka, 2009), (Kiokias, 2006).

La gran reactividad de los carotenoides, dada por su sistema de dobles enlaces conjugados, los hace susceptibles a la rotura oxidativa por medio de mecanismos como la co-oxidación, la degradación enzimática (por lipoxigenasa) o foto-oxidación lo que genera la formación de un grupo de compuestos derivados, denominados apocarotenoides los cuales muestran las características de sus precursores, pero además de pigmentos se caracterizan por poseer aroma y sabor, cualidad que resulta muy útil para la industria de alimentos. Cada doble enlace en un carotenoide es susceptible a la oxidación, generándose por cada ruptura y oxidación posterior del doble enlace dos nuevos apocarotenoides. Cuando dos apocarotenoides se unen para formar una sola molécula se forma un diapocarotenoide, tal es el caso de la bixina y la norbixina compuestos presentes en las semillas del achiote.

3.4.1.2 Bixina

La bixina es el compuesto mayoritario de las semillas de la especie *Bixa orellana*, aproximadamente el 80% del pigmento presente en las semillas corresponde a este apocarotenoide. Su nombre se deriva del mismo nombre científico de la planta. Este compuesto es químicamente un éster monometildicarboxílico de naturaleza apolar y fórmula empírica $C_{25}H_{30}O_4$ y se encuentra generalmente en su isómero geométrico *cis* pero puede convertirse

en su forma *trans* que es más estable (Devia, 2003). Este compuesto confiere una tonalidad que varía entre el rojo y el amarillo propiedad que lo hace útil como aditivo alimenticio.

3.4.1.3 Norbixina

La remoción hidrolítica por saponificación del grupo metil éster de la bixina da origen a la norbixina, ácido dicarboxílico de formula empírica ($C_{24}H_{28}O_4$) soluble en agua y también presente en las semillas de *Bixa orellana*. (ver figura 8)

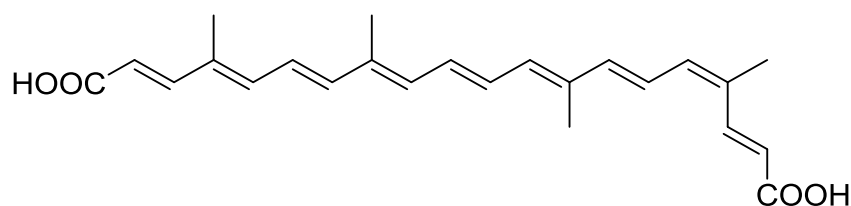


Figura 8. Estructura química de la norbixina

3.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias vegetales con una estructura básica como se muestra en la figura 9. Estas moléculas tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono por lo que son consideradas como moléculas $C_6C_3C_6$.

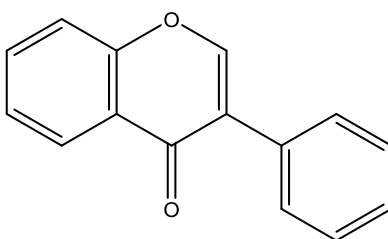


Figura 9. Estructura básica de los flavonoides

Estos compuestos fueron descubiertos por el Dr. Albert Szent-Gyorgi, premio nobel de bioquímica en el año 1937, quien encontró que este tipo de sustancias favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación (Martínez, 2005)

Los flavonoides se encuentran presentes en la naturaleza en un sin número de flores, frutos y hojas confiriendo colores como el amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, entre otros. La figura 10 muestra la estructura de uno de los flavonoides más comunes: la Quercetina, la cual se ha utilizado como terapia para enfermedades cardiovasculares, colesterolemia, insuficiencia venosa crónica, hepatitis, asma entre otras.

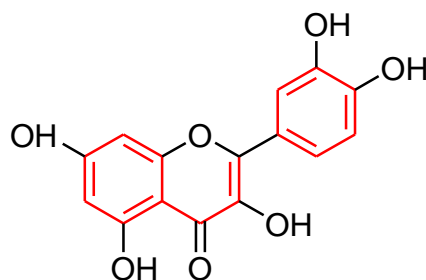
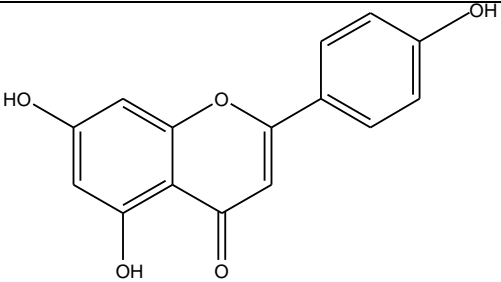
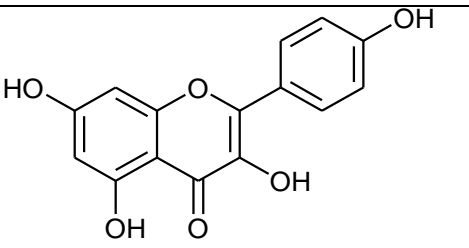
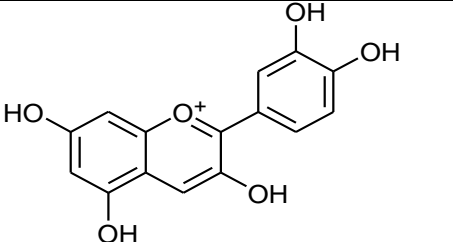
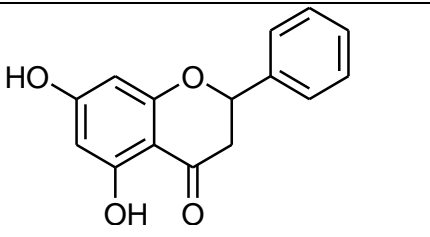


Figura 10. Estructura química de la quercetina. En rojo la estructura básica de los flavonoides

En la actualidad se han encontrado más de 4000 flavonoides los cuales se clasifican en varios grupos de acuerdo a las diferencias estructurales en la cadena carbonada central; encontrando así: chalconas, flavonas, flavonoles, isoflavonoides entre otros. Ejemplos de estos compuestos pueden verse en la tabla 3.

Diversos estudios hablan sobre la utilidad de este tipo de sustancias como hepatoprotectores. Tal es el caso del *Gingko biloba*, un medicamento con un alto contenido de flavonoides que actúan a nivel circulatorio inhibiendo la agregación plaquetaria. (Salvador, 1995).

Tabla 3. Estructura de algunos flavonoides y su clasificación.

Clase	Nombre común	Estructura química
Flavonas	Apigenina	
Flavonoles	Kaemferol	
Antocianidinas	Cianidina	
Flavanonas	Pinocembrina	

3.5 Antioxidantes

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que disminuye la generación de productos oxidados en un sistema de reacciones de radicales libres. Este concepto fue introducido por Moureau hace más de setenta años para describir el efecto de los polifenoles en la polimerización de la acroleína.

En las últimas dos décadas la palabra antioxidante ha adquirido un nuevo significado, en este caso biomédico, constituyéndose en la descripción de un tipo de medicamentos o de nutraceuticos, caracterizados por producir una disminución de la velocidad de las reacciones de radicales libres en el organismo humano. La presencia de antioxidantes es notable en diversos alimentos y plantas como es el caso de la alicina presente en el ajo, el ácido

elágico que hace parte de frambuesas, cerezas, uvas, kiwis, el licopeno responsable del color rojo de los tomates, la bixina y la norbixina presentes en la semilla de *Bixa orellana*.

3.5.1 Metabolitos de *Bixa orellana* con poder antioxidante

El pigmento que se obtiene a partir de las semillas de esta especie está constituido principalmente por bixina, norbixina, δ -caroteno, fitoeno, entre otros. La acción antioxidante de estos metabolitos ha sido ampliamente estudiada y corroborada.

Kiokias y colaboradores estudiaron el poder antioxidante de diferentes carotenoides encontrando que bixina y norbixina tienen el *mayor* poder antioxidante entre los metabolitos estudiados: luteína, beta-caroteno, licopeno. (Kiokias, 2006)

En otro reporte del mismo autor se comprobó el poder antioxidante del apocarotenoide norbixina, que actuó en la inhibición del deterioro de lípidos en un sistema aceite de oliva no virgen- emulsiones de agua- aceite de oliva. (Kiokias, 2003).

(Kovary K., et al., 2001) demostraron que la norbixina posee potencial para la protección del ADN contra el daño oxidativo inducido por peróxidos e iones metálicos.

4. METODOLOGÍA

4.1 Procedimientos generales

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizó sílica Kieselgel 60 F₂₅₄ marca Merck. Como fase móvil se usaron diferentes sistemas de solventes, entre ellos mezclas hexano/acetona, hexano/AcOEt, CHCl₃/MeOH. El seguimiento de las placas cromatográficas se logró por exposición a luz UV (254 y 360 nm) empleando una cámara ultravioleta UVGL-58.

Las separaciones cromatográficas en columna se realizaron usando como fase estacionaria sílica gel 60 Merck (230-400 mesh). Los solventes utilizados fueron hexano y acetona grado analítico.

Para la extracción en fase sólida se utilizó un cartucho de polipropileno con relleno de sílica. Los solventes de elución utilizados fueron hexano y hexano/acetona (8:2).

Los espectros de masas fueron realizados en un cromatógrafo de gases acoplado a masas de referencia GCMS-QP2010.

Para el espectro de resonancia magnética nuclear se empleó un equipo de resonancia magnética nuclear marca BRUKER 4000 Ultrashield de 400 MHz, la muestra se disolvió en cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ en ppm y están referenciados con respecto al TMS.

Para los ensayos de actividad antioxidante se utilizó un microlector de placas marca Mettertech referencia M965⁺ y radical libre DPPH (difenil-(2,4,6-trinitrofenil) iminoazanium, marca Aldrich).

4.2 Recolección del material vegetal

Las semillas fueron obtenidas de un cultivo orgánico ubicado en el Jardín Botánico Juan María Céspedes de la ciudad de Tuluá, Valle del Cauca. Las semillas se recibieron frescas y secas y fueron conservadas a temperaturas menores de 6 °C y alejadas de la luz mediante frascos ámbar, con el fin de

garantizar su preservación. La mitad de las semillas fueron molidas a un tamaño de partícula de 40 mesh y almacenadas de igual manera.

4.3. Extracción Supercrítica

4.3.1. Condiciones experimentales

Se aplicó extracción con CO₂ SC, siguiendo la metodología propuesta por Gómez, aplicando un diseño completamente aleatorio en arreglo factorial 2 x 6 para 2 experimentos (Gómez, 2004).

Para el primer experimento se tienen 2 factores como son la forma física de la semilla y la presión de extracción, con 2 niveles (entera y molida) para el primer factor y 6 niveles (1500, 1700, 2000, 2300, 2500, 3000 psi) para el segundo factor. Respecto al segundo experimento los factores son presencia de co-solvente y presión de extracción, con dos niveles (con MeOH y sin MeOH) para el primer factor y 6 niveles (1500, 1700, 2000, 2300, 2500, 3000 psi) para el segundo factor. Como variable de respuesta se tiene el porcentaje de rendimiento (% Rdto). Cada ensayo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad del mismo con un tiempo de extracción de 45 minutos pues después de este tiempo el rendimiento es mínimo y una temperatura de extracción de 40°C. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA el cual se realizó con el programa Minitab 16. Las condiciones experimentales se muestran en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Orden y condiciones experimentales analizando la influencia de la forma física de la semilla en la obtención del extracto de las semillas de *Bixa orellana* L.

ENSAYO	PRESION (psi)	TEMPERATURA	SEMILLA
1	3000	40	Molida
2	2500	40	Molida
3	2000	40	Entera
4	2000	40	Molida
5	1700	40	Entera
6	1500	40	Molida
7	3000	40	Entera

8	2500	40	Entera
9	2300	40	Molida
10	1700	40	Molida
11	1500	40	Entera
12	2300	40	Entera

Tabla 5. Orden y condiciones experimentales analizando la influencia del co-solvente en la obtención del extracto de las semillas de *Bixa orellana*

ENSAYO	PRESION (psi)	TEMPERATURA °C	CO-SOLVENTE (3mL ± 0.001mL)
13	2300	40	Metanol
14	2500	40	Metanol
15	2300	40	Sin solvente
16	2000	40	Sin solvente
17	2500	40	Sin solvente
18	3000	40	Metanol
19	1500	40	Metanol
20	1500	40	Sin solvente
21	2000	40	Metanol
22	1700	40	Sin solvente
23	3000	40	Sin solvente
24	1700	40	Metanol

4.3.2 Equipo de extracción

Un esquema del equipo utilizado para la extracción supercrítica se muestra en la figura 11.

En términos generales el equipo consta de un cilindro de CO₂ con sifón (A) que abastece el fluido y que va conectado a un cilindro de alta presión (CAP) en el que se lleva a cabo la carga de CO₂ proceso que se realiza a temperaturas menores de los 10°C, con una duración de 2 horas aproximadamente, verificando una carga completa y/o efectiva cuando se alcanza una presión igual o superior a los 2000psi a temperatura ambiente.

Después de suministrado el CO₂ en el cilindro se procede a expandir el gas supercrítico controlando la temperatura del baño térmico BT1 entre valores de 50-60°C dependiendo de la presión deseada de extracción. Obtenida esta presión deseada se abre la válvula (VM) que va hacia la celda de extracción (D) y se deja fluir el gas hacia la misma donde previamente se ha introducido la muestra. Esta celda se encuentra sumergida en un segundo baño térmico BT2 a una temperatura de 40°C que corresponde a la temperatura de extracción. A partir de ese momento se contabilizó el tiempo de extracción que fue en todos los ensayos de 45min. Finalmente el extracto oleoso fue colectado en los viales E y F y guardado aislado de la luz y a temperaturas de 5°C.

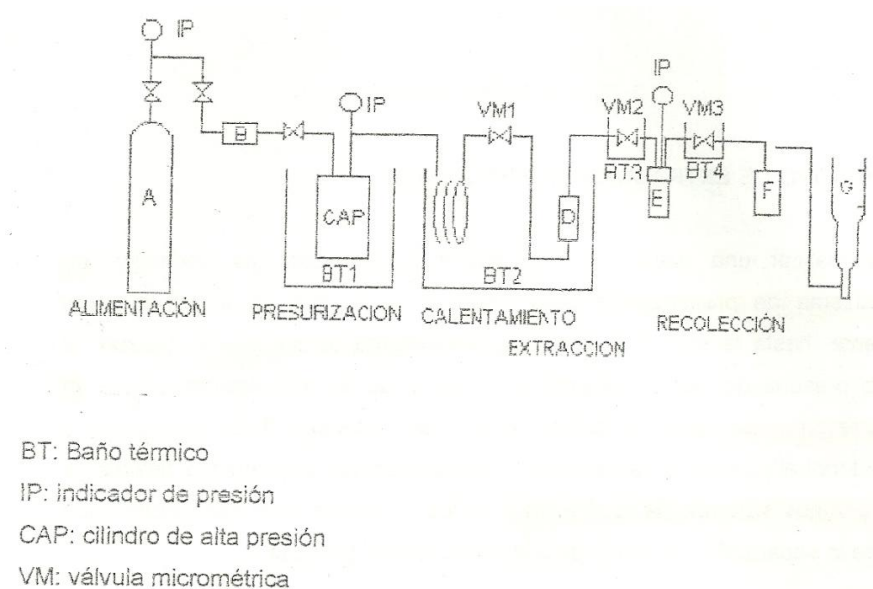


Figura 11. Esquema del equipo de extracción SC utilizado

4.4 Separación de compuestos apolares libres de bixina a partir de un extracto de fluidos supercríticos

A partir de un extracto de FSC sin MeOH, se realizó separación por extracción en fase sólida en un cartucho con relleno de sílica como el que se muestra en la figura 12., Con el propósito de obtener componentes de aceites esenciales libres de bixina. Para esto el extracto se disolvió en 1mL de Hexano y se adicionó al cartucho. Los solventes de elución fueron Hexano (2mL) para la fracción 1 y Hexano/Acetona (8:2) (2mL) para la fracción 2. Las 2 fracciones obtenidas se analizaron por CG-EM.

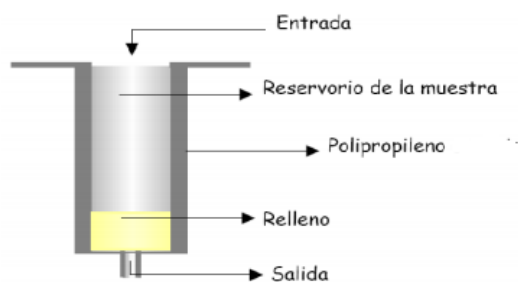


Figura 12. Cartucho para la extracción en fase sólida.

4.5 Extracción y separación de bixina por Ultrasonido

Como técnica de exploración y con el fin de conocer el porcentaje de bixina presente en las semillas, se llevó a cabo la extracción y separación de ésta a partir de una muestra de 200g de semilla molida y seca. El proceso de extracción fue por ultrasonido durante 15 minutos a 110 rpm. Con 4 repeticiones, usando MeOH como solvente. El sobrenadante obtenido se filtró y se rotavaporó en un rotavaporador Buchi R-200. Posteriormente el extracto obtenido por rotavaporación se sometió a extracción líquido-líquido, para esto se disolvió en 100ml de cloroformo y se adicionó bicarbonato de sodio al 2.5% permitiendo la separación de bixina en forma de sal, que posteriormente se neutralizó con HCL concentrado y se extrajo con Éter dietílico. Finalmente la solución que contenía el compuesto se secó con sulfato de sodio anhidro y se rotavaporo para la obtención de bixina. El análisis espectroscópico del compuesto obtenido se llevó a cabo por RMN-¹H y EM-APCI.

4.6 Extracción de metabolitos por ultrasonido usando hexano

Con el objetivo de obtener otro perfil de metabolitos presentes en las semillas, se realizó extracción por ultrasonido con hexano de las semillas secas y molidas usando para esto un sonicador Branson-2510. El proceso se realizó con cuatro repeticiones, los extractos obtenidos se juntaron, filtraron y rotaevaporaron en un rotavaporador Buchi R-200, hasta la mitad de su volumen inicial. Posteriormente se separaron los compuestos presentes en el extracto por medio de una columna cromatográfica de 70 cm de largo y 2.8 cm de diámetro. Como fase estacionaria se emplearon 11.9 g de sílica gel 60, los

cuales alcanzaron los 40 cm de altura. La fase móvil fue hexano y se obtuvieron 2 fracciones, la primera incolora y la segunda de color anaranjado.

4.7 Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

Se determinó la actividad antioxidante del extracto oleoso de la especie *Bixa orellana* haciendo uso del radical libre, 1,1 difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). El procedimiento consistió en preparar soluciones diluidas de las muestras y de dos estándares, (vitamina C y Quercetina) los cuales se dejaron reaccionar en un microlector de placas, con soluciones de DPPH 132ppm; para este procedimiento se utilizó metanol grado HPLC como solvente. Se midió la absorbancia, a una longitud de onda de 520 nm, luego se dejó reaccionar durante una (1) hora y se volvió a realizar la medición. El proceso se realizó para 2 muestras (extracto obtenido por FSC (M_{FSC}) y extracto obtenido por ultrasonido (M_{US})) y cada una se realizó por triplicado.

El esquema de la reacción en el microlector de placas se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 6. Esquema de distribución de las soluciones en la placa.

Concentración (ppm)											
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	BLANCO
Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	Vit _C	MeOH
M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	MeOH
M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	MeOH
M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	M_{FSC}	MeOH
M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	MeOH
M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	MeOH
M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	M_{US}	MeOH
Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	Q _C	MeOH

Cada casilla corresponde a un pozo donde tiene lugar la reacción entre el radical DPPH y Vitamina C (Vit_C), Muestra de fluidos supercríticos (M_{FSC}), muestra de ultrasonido (M_{US}) y Quercetina (Q_C) respectivamente. El blanco corresponde a metanol (MeOH) con DPPH.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Resultados de la extracción por Fluidos Supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos se llevó a cabo siguiendo 2 experimentos en los que se analizó la influencia de la forma física de la semilla, (semilla molida y entera) y de la presencia de co-solvente, (con MeOH y sin MeOH) en el rendimiento de extracción. Las tablas 7 y 8 muestran los resultados obtenidos para los experimentos, cada ensayo se realizó por triplicado.

TABLA 7. Resultados de la extracción por FSC analizando la influencia de la forma física de la semilla en el % de rendimiento.

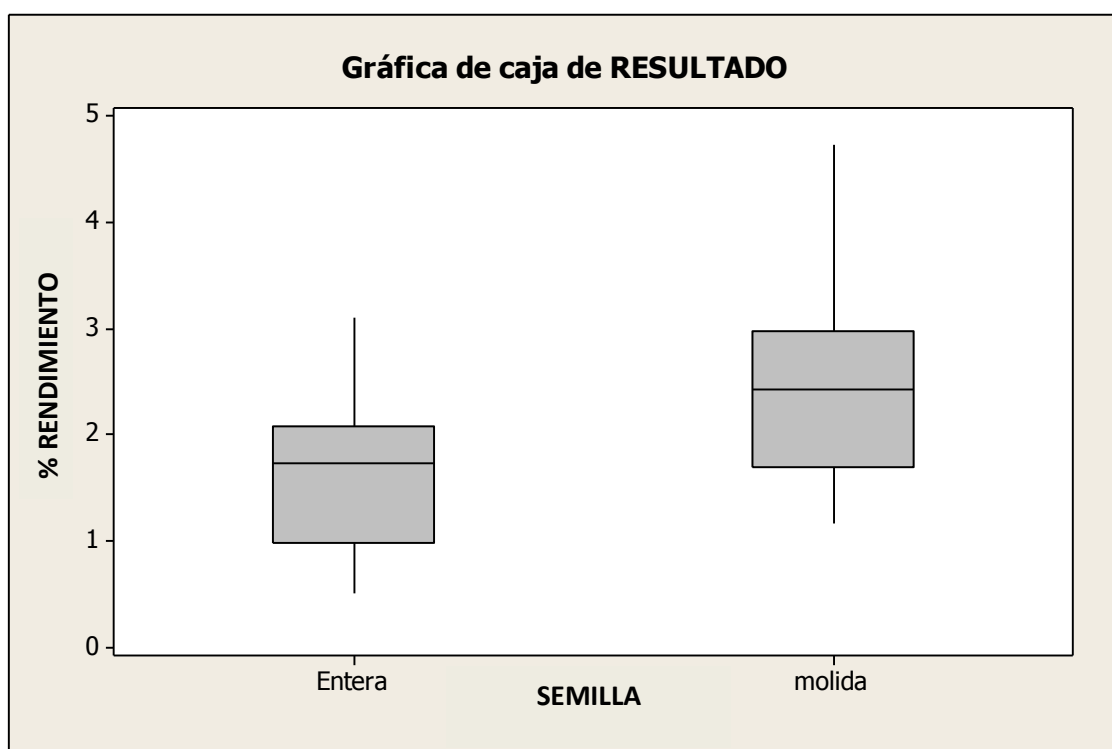
ENSAYO	PRESION (psi)	MUESTRA	% RENDIMIENTO PROMEDIO	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
1	3000	Molida	2.94	2,26
2	2500	Molida	3.96	17,33
3	2000	Entera	1.71	7,87
4	2000	Molida	2.84	2,66
5	1700	Entera	0.60	13,64
6	1500	Molida	1,78	9,45
7	3000	Entera	2.70	14,35
8	2500	Entera	2.08	1,73
9	2300	Molida	2.06	3,40
10	1700	Molida	1.26	7,57
11	1500	Entera	1.03	7,58
12	2300	Entera	1.72	11,09

TABLA 8. Resultados de la extracción por FSC analizando la influencia del co-solvente en el % de rendimiento

ENSAYO	PRESION (psi)	SOLVENTE (3mL \pm 0.001mL)	% RENDIMIENTO PROMEDIO	COEFICIENTE DE VARIACION (%)
1	2300	Metanol	5.11	5,97
2	2500	Metanol	6.04	2,03
3	2300	Sin solvente	3.41	15,51

4	2000	Sin solvente	3.10	4,34
5	2500	Sin solvente	4.50	3,15
6	3000	Metanol	3.34	15,18
7	1500	Metanol	2.56	22,27
8	1500	Sin solvente	1.98	39,55
9	2000	Metanol	5.14	3,70
10	1700	Sin solvente	1.20	5,83
11	3000	Sin solvente	2.76	4,87
12	1700	metanol	1.60	13,62

Con los resultados obtenidos del primer experimento (Tabla 7) se realizó un análisis de Varianza ANOVA que permitió comprobar estadísticamente si existe o no influencia de los factores implicados en el proceso sobre el rendimiento de extracción. El $F_{\text{calculado}}$ es 101,24 siendo mayor que el F_{tablas} (2,62) para un nivel de certeza del 95%, por lo tanto, en cuanto al factor forma física de la semilla se rechaza la hipótesis nula, y se deduce que sí existe influencia de la forma física de la semilla sobre el experimento.

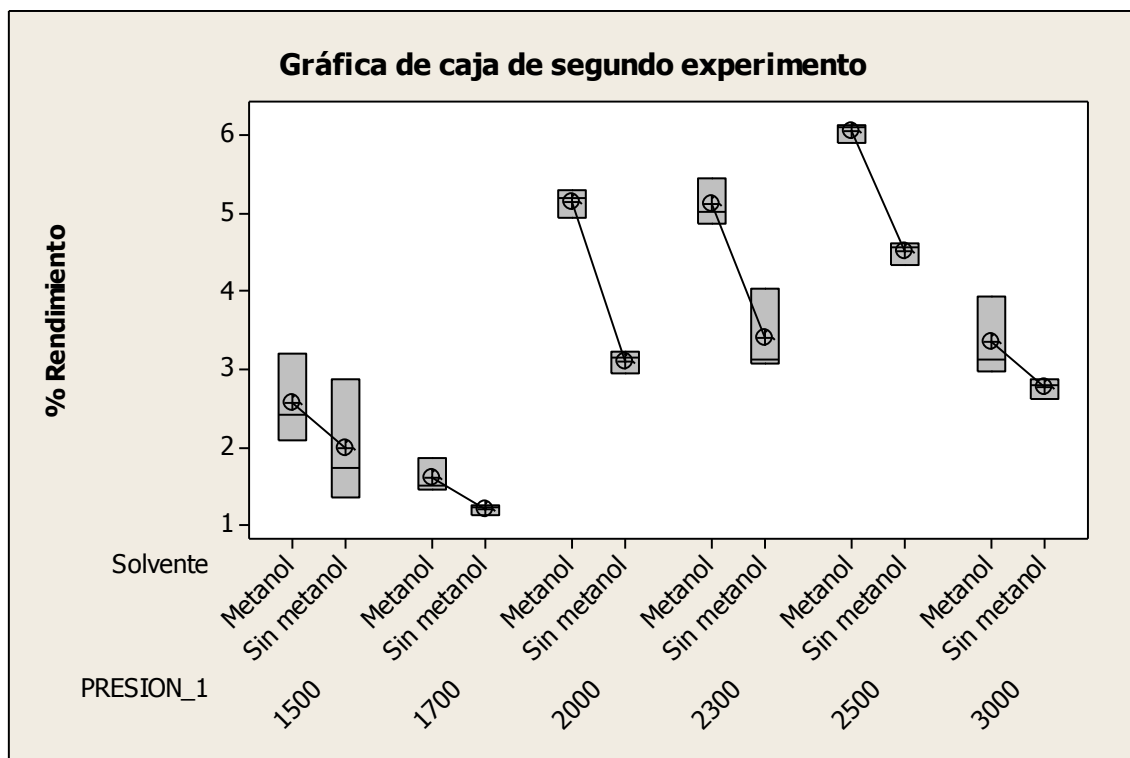


La gráfica de caja para el primer factor muestra claramente que los rendimientos obtenidos con semilla molida son estadísticamente diferentes a los obtenidos con semilla entera observando también una variabilidad mayor.

Con este resultado se procedió a realizar el segundo experimento en el cual se analizó la influencia de la adición de co-solvente sobre el porcentaje de rendimiento de extracción, usando para todos los ensayos semilla molida. El análisis ANOVA para este experimento mostró un $F_{\text{calculado}}$ de 81.23 y un F_{critico} de 2,62 para $P = 0.05$. A partir de este valor se rechaza la hipótesis nula, y por lo tanto, existe influencia del co-solvente en el rendimiento de extracción. La tabla 9 muestra los datos arrojados por el método ANOVA.

TABLA 9. Resultados del análisis de varianza ANOVA para primer experimento (izq) y segundo experimento (der)

Primer experimento							Segundo experimento										
Factor	Type	Levels	Values				Factor	Type	Levels	Values							
PRESION	fixed	6	1500.	1700.	2000.	2300.	2500.	3000	presion	fixed	6	1500.	1700.	2000.	2300.	2500.	3000
Tamaño	fixed	2	Entera. molida				Solvente	fixed	2	Metanol. Sin metanol							
Analysis of Variance for RESULTADO, using Adjusted SS for Tests							Analysis of Variance for Recuperacion, using Adjusted SS for Tests										
Source		DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	Source		DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F				
PRESION_1		5	19,6964	19,6964	3,9393	63,72	presion		5	60,9249	60,9249	12,1850	84,62				
Tamaño		1	6,2583	6,2583	6,2583	101,24	Solvente		1	11,6964	11,6964	11,6964	81,23				
PRESION_1*Tamaño		5	2,7180	2,7180	0,5436	8,79	presion*Solvente		5	3,6876	3,6876	0,7375	5,12				
Error		24	1,4837	1,4837	0,0618		Error		24	3,4560	3,4560	0,1440					
Total		35	30,1564				Total		35	79,7649							
S = 0,248635 R-Sq = 95,08% R-Sq(adj) = 92,83%							S = 0,379473 R-Sq = 95,67% R-Sq(adj) = 93,68%										



La grafica de caja para el segundo experimento muestra claramente que el rendimiento de extracción obtenido a 2500 psi y con adición de co-solvente es estadísticamente diferentes con relación a los rendimientos de extracción restantes. También se puede observar que el valor más alto de porcentaje de rendimiento (6.04%) se obtiene a una presión de extracción de 2500 psi, temperatura de extracción 40 °C usando semilla molida y 3mL de Metanol como co-solvente. En trabajos previos, (Murcillo, 2009) el mayor rendimiento de extracción se obtuvo a 4000 psi y 60°C obteniendo un valor de 4.05%, por lo que puede decirse que se logró mejorar el rendimiento de extracción mediante la técnica de fluidos supercríticos pues se obtuvo un mayor rendimiento a una menor temperatura y presión.

La grafica de caja para el segundo experimento también permite deducir que la presión y la temperatura actúan conjuntamente en el proceso, y no de forma individual pues inicialmente se esperaba que a mayor presión se obtuviera un mayor rendimiento de extracción, sin embargo el mayor rendimiento se dio a una presión tal en la que en conjunto con la temperatura se logra una densidad de fluido óptima, que garantiza una mejor solubilidad de los metabolitos. Esto se explica a partir de los valores de $F_{\text{calculado}}$ y F_{critico} obtenidos para la

interacción de los factores los cuales son respectivamente 5,12 y 2,62 para un nivel de confianza del 95%. El hecho de que el mayor rendimiento se diera usando semilla molida y co-solvente puede ser causa de la interacción entre el soluto y el solvente, mediante fuerzas intermoleculares del tipo puente de hidrógeno, lo que permite un mayor arrastre de analitos pues se favorece la desorción de los mismos de los centros activos de la muestra y esto se ve reflejado en un mayor rendimiento en el proceso.

5.1.1 Identificación de metabolitos a partir del extracto de Fluidos Supercríticos.

A partir del extracto de mayor rendimiento que se obtuvo bajo las condiciones de 2500psi para la presión de extracción, adición de co-solvente, y utilizando semilla molida, el cual presentó un color naranja-rojizo y una consistencia oleosa se obtuvo el perfil de HPLC que se muestra a continuación.

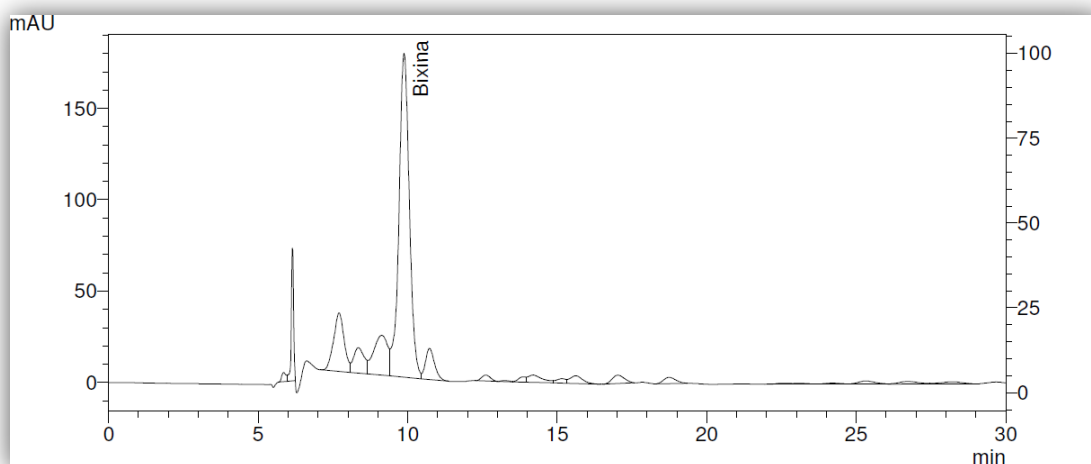


Figura 13. Perfil de HPLC del extracto oleoso obtenido por FSC.

Se observa un pico muy abundante con un tiempo de retención de 9.87min, que se presume es bixina lo cual se deduce a partir de la coloración del extracto obtenido



Figura 14. Apariencia del extracto obtenido por FSC.

y del perfil de espectro UV-Vis el cual mostró un máximo de absorción a 458nm con un rango de absorción entre 458nm y 485nm dentro del que se encuentra la absorción de los apocarotenoides. Generalmente la bixina presenta un máximo de absorción a los 461nm, por lo que podría pensarse que hay más de un compuesto presente en el extracto, con la misma naturaleza de la bixina.

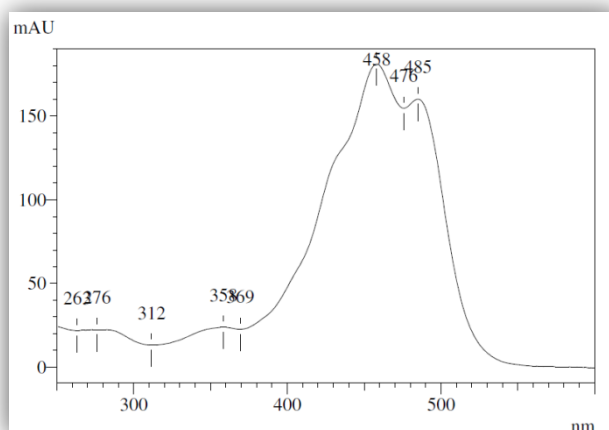


Figura 15. Espectro UV-Vis del extracto por fluidos supercríticos.

La presencia de bixina se comprueba posteriormente (sección 5.2.1) mediante EM-APCI.

Paralelamente se tomó una muestra del mismo extracto y se analizó mediante CG-EM obteniendo el siguiente cromatograma:

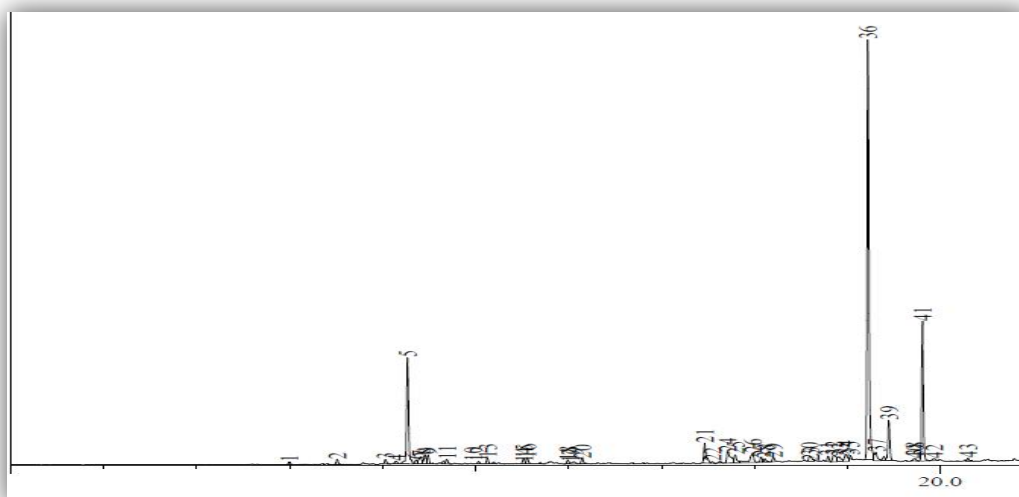


Figura 16. Perfil de CG-EM del extracto oleoso obtenido por FSC.

Como puede observarse aparece un pico mayoritario (pico 36) con un tiempo de retención de 19.21min y un porcentaje de área relativo del 31.47%. El espectro de masas por impacto electrónico del pico mencionado muestra un ión molecular a m/z 290, un pico base a m/z 69, y picos característicos a m/z 81 y m/z 93. Para m/z 290 es compatible con la formula $C_{20}H_{34}O$.

Al comparar el espectro de masas obtenido (figura 17) con el reportado en la base de datos SDBS (Figura 18)

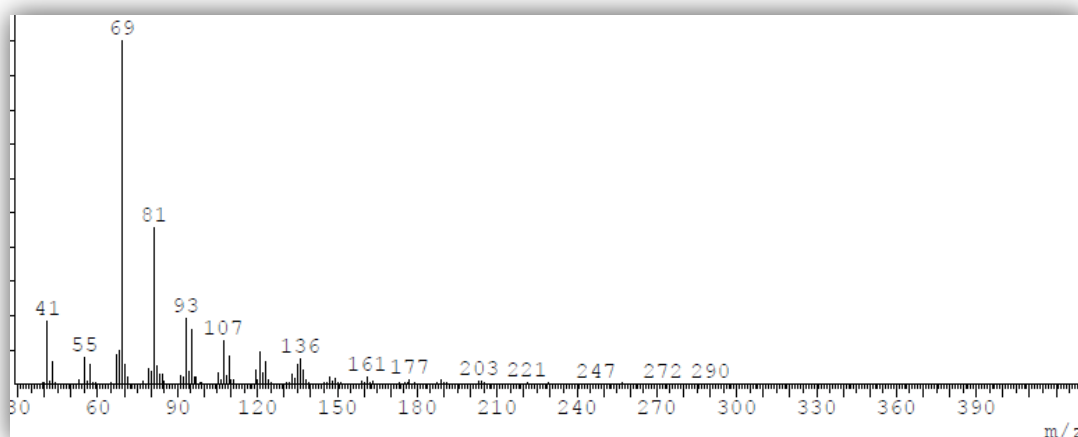


Figura 17. Espectro de masas por impacto electrónico (IE) del pico 36

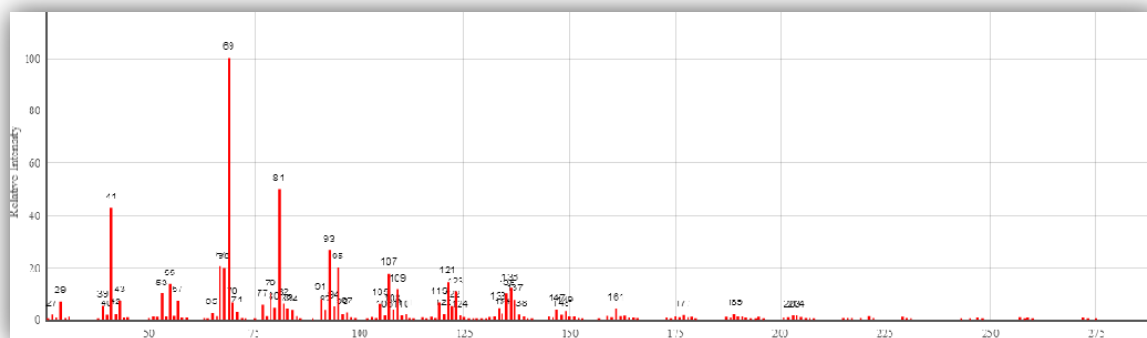


Figura 18. Espectro de masas obtenido de la base de datos NIST para *trans*-geranylgeraniol.

se asigna provisionalmente este pico al diterpeno *trans*-geranylgeraniol. Dicho compuesto ha sido previamente aislado de las semillas de la especie *Bixa orellana* (Isaac, 1989). Además, Mercadante y colaboradores aislaron derivados esterificados de geranylgeraniol a partir de semillas de achiote (Mercadante, 1999). Se observan también los picos 39 y 41 con tiempos de retención de 19.44min y 19.80min respectivamente, los cuales se asignan tentativamente con ayuda de la biblioteca como *cis*-geranylgeraniol y 3,7,11,15-tetrametilhexadeca-1,6,10,11-tetraen-3-ol respectivamente y que corresponden a isómeros del *trans*-geranylgeraniol. La tabla 10, muestra las estructuras de estos compuestos.

Otro compuesto que se logró detectar en el extracto de *Bixa orellana* es el α -guaiano (pico 5), un sesquiterpeno de fórmula $C_{15}H_{24}$ con un ion molecular a m/z 204 y pico base a m/z 105. El cual aparece con un tiempo de retención de 14.26min y un área del 8.5%. La tabla 11 muestra algunas de las posibles fragmentaciones de masas para este compuesto. La figura 19 muestra el espectro de masas obtenido correspondiente al pico 5 mientras que la figura 20 corresponde al espectro obtenido de la base de datos NIST para el α -guaiano.

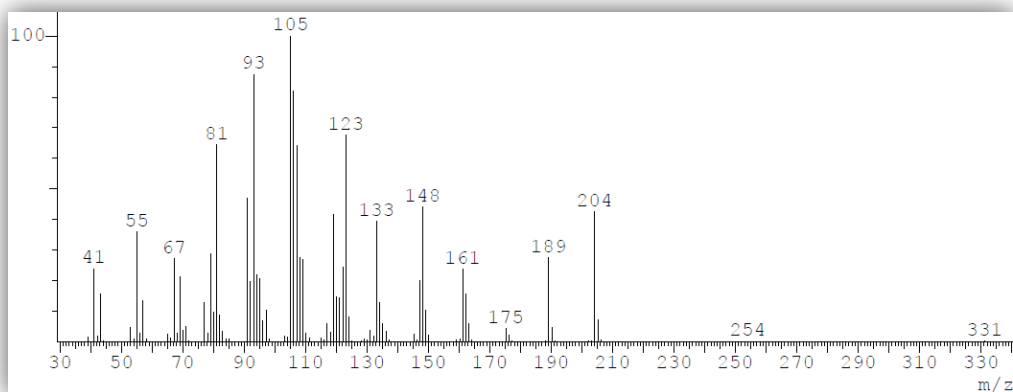


Figura 19. Espectro de masas por IE del pico 5

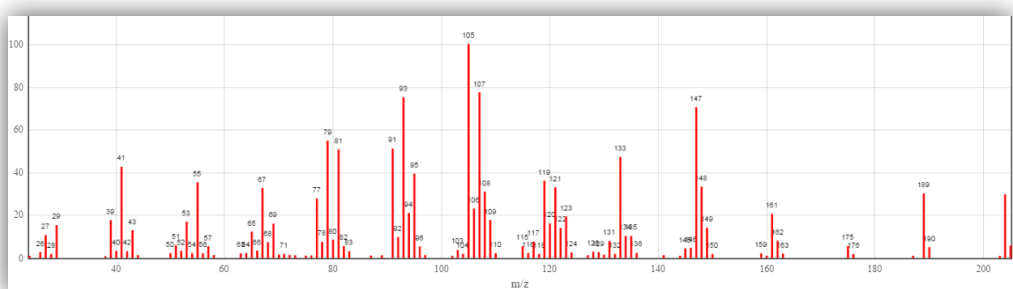
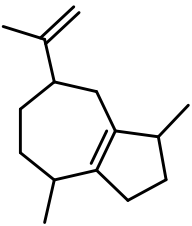
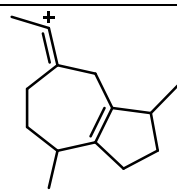
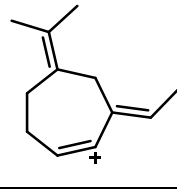
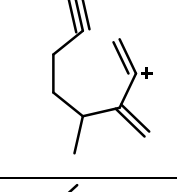
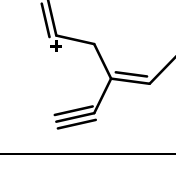


Figura 20. Espectro de masas obtenido de la base de datos NIST para α -guaieno

Tabla 10. Estructura de los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de achiote.

COMPUESTO	ESTRUCTURA
<i>trans</i> -geranilgeraniol (pico 36)	<chem>CC(=C)CC/C=C\CC/C=C\CC/C=C\CO</chem>
<i>cis</i> -geranilgeraniol (pico 39)	<chem>CC(=C)CC/C=C\CC/C=C\CC/C=C\CO</chem>
3,7,11,15-tetrametilhexadeca-1,6,10,11-tetraen-3-ol (pico 41)	<chem>CC(=C)CC/C=C\CC/C=C\CC(C)(O)C=C</chem>

Tabla 11. Algunas posibles fragmentaciones de uno de los compuestos identificados en el extracto de achiote.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	FRAGMENTACIONES	m/z
α -Guaieno (pico 5)			189
			161
			147
			133

5.1.2 Obtención de compuestos apolares libres de bixina a partir del extracto de Fluidos Supercríticos.

Posterior a la obtención de los extractos de fluidos supercríticos se tomó CCF observando gran cantidad de compuestos apolares, la figura 21 muestra imágenes de las placas cromatográficas a onda corta (254nm, izq) y onda larga (360nm, der)

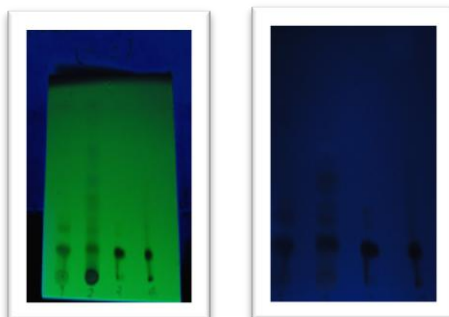


Figura 21. Placas cromatográficas de los extractos de fluidos supercríticos fase móvil Hexano:Acetona (8:2).

Con el propósito de separar y elucidar algunos de estos compuestos observados se realizó una extracción en fase sólida siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.4. A partir de este método se obtuvieron 2 fracciones incoloras, libres de bixina. A continuación se muestran los respectivos cromatogramas y espectros de masas del componente más abundante para las dos fracciones obtenidas.

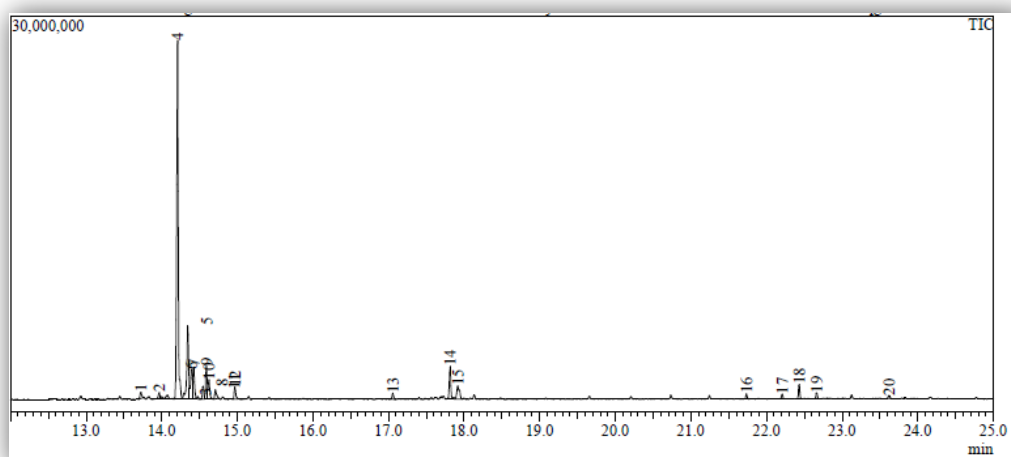


Figura 22. Perfil de CG correspondiente a la fracción 1.

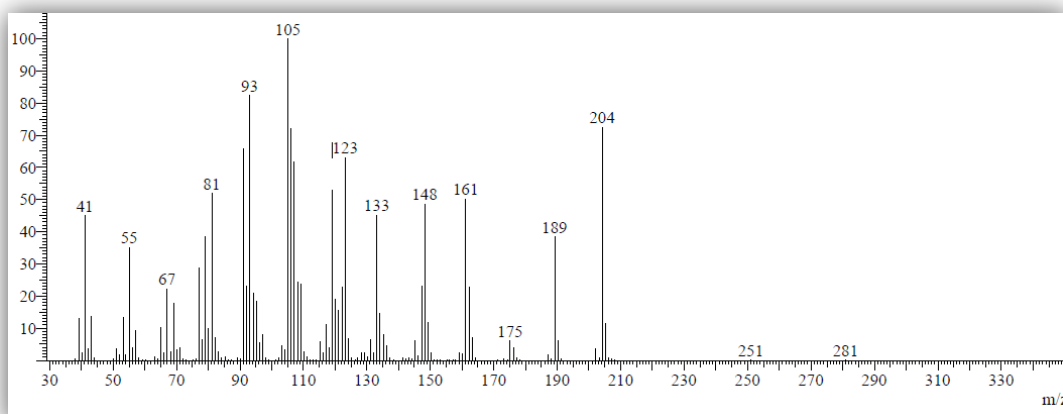


Figura 23. Espectro de masas por IE del pico 4 de la fracción 1

A partir del espectro de masas obtenido y con ayuda de la biblioteca de compuestos se asigna este pico al compuesto α -guaieno previamente descrito en la sección 5.1.1. Este metabolito se ha identificado en trabajos previos de diversas familias florales como *Araceae*, *Rubiaceae*, *Lauraceae*, (Bates, 1962)

las cuales poseen propiedades insecticidas y medicinales, asociadas a este metabolito secundario, lo que permite presumir que las propiedades insecticidas asociadas a la especie *Bixa orellana* son provocadas por la presencia de este metabolito en la semilla de esta especie.

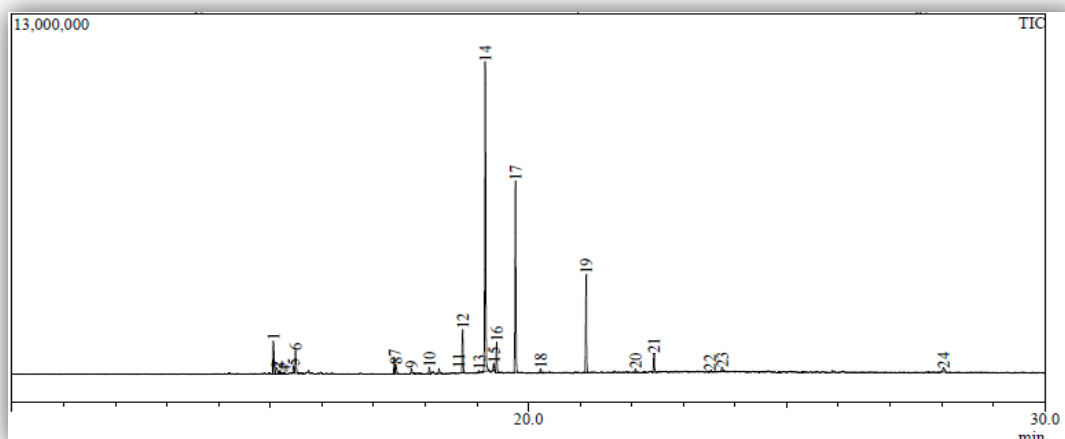


Figura 24. Perfil de CG correspondiente a la fracción 2

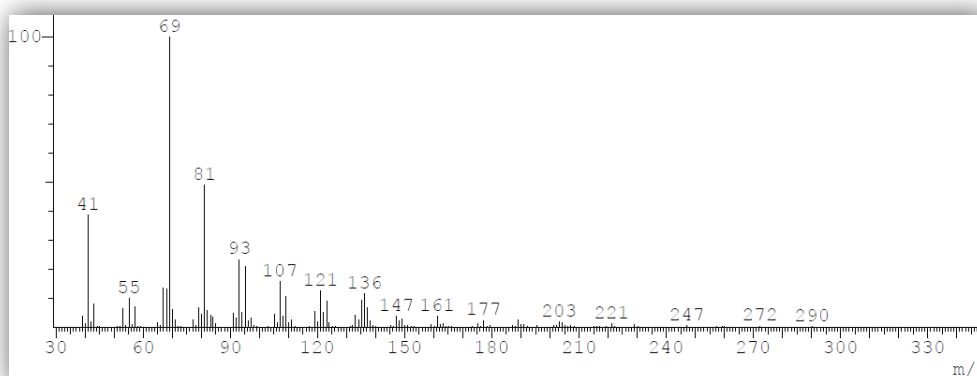


Figura 25. Espectro de masas por IE del pico 14 de la fracción 2

Las figuras 25 y 26 muestran el perfil de CG para la fracción 2 y el correspondiente espectro de masas para el pico mayoritario (pico 14) de esta fracción respectivamente. Por comparación de espectros con las bases de datos se asigna como 3,7,11,16-tetrametil-2,6,10,14-Hexadeca-tetraen-1-ol (*trans-geranilgeraniol*) un diterpeno previamente identificado en la sección 5.1.1.

De esta manera a partir de la extracción en fase solida se confirma la presencia de estos dos compuestos en las semillas de achiote.

5.2 Resultados de la extracción y separación de bixina por ultrasonido

La extracción de bixina se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.5. Este proceso permitió la obtención de un sólido de consistencia oleosa y color rojizo (ver figura 26) con un porcentaje de rendimiento del 1.5%. En la literatura se reporta un contenido de bixina en las semillas de alrededor del 3% (Arce (Ed.), 1983) esta diferencia puede asociarse al método de extracción, así como a la región de cultivo de la semilla y la variedad de la misma.



Figura 26. Apariencia del compuesto obtenido a partir de ultrasonido y extracción líquido-líquido.

5.2.1 Identificación de bixina por EM-APCI

Del sólido obtenido por ultrasonido, descrito en la sección 5.2 se tomó una pequeña cantidad para realizar el análisis de masas. El análisis de masas de este compuesto se llevó a cabo mediante la técnica APCI (ionización química a presión atmosférica), una de las técnicas de ionización más usadas para análisis de carotenoides debido a que se utiliza una menor presión, lo que permite que la intensidad del pico de ion molecular sea mayor pues se producen menos fragmentaciones, facilitando así la asignación del peso molecular de la muestra y por tanto su identificación. De esta manera, la muestra se disolvió en metanol se agregó un poco de acetato de amonio, y se inyectó por inserción directa en una trampa iónica. El tiempo de corrida fue de 12.47min.

En el modo positivo se observó un pico correspondiente a la molécula protonada $[M + H]^+$ a m/z 395 el cual es coherente con $C_{25}H_{30}O_4$ y pérdidas

características de H_2O (m/z 377), CH_3OH (m/z 363), $\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO}$ (m/z 335) y $\text{CH}_3\text{OH} + \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$ (m/z 317). La figura 27 corresponde al espectro de masas obtenido para el modo positivo.

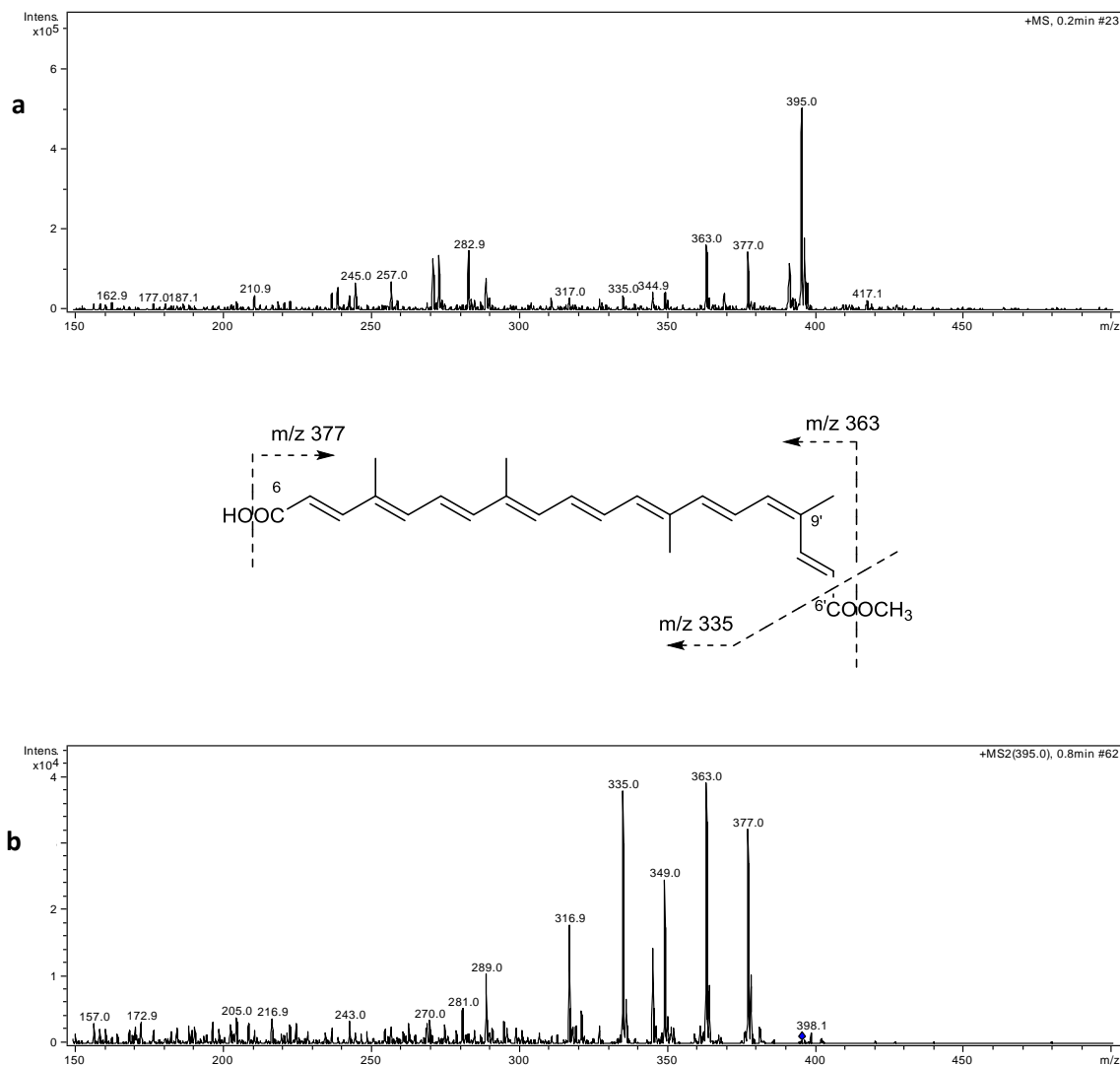


Figura 27. Espectro de masas por APCI modo positivo; a= 0.2min, b= 0.8min

El espectro de masas del modo negativo confirmó la asignación del peso molecular, con un pico correspondiente a la molécula desprotonada $[\text{M}-\text{H}]^+$ a m/z 393 y perdidas de CH_3OH a (m/z 361), COO^\cdot (m/z 349) y $\text{CH}_3\text{OH} + \text{COO}^\cdot$ (m/z 317). Adicionalmente estas fragmentaciones se confirmaron con algunos patrones de fragmentación reportados en la literatura (Rehbein, 2007) y (Renan, 2009)

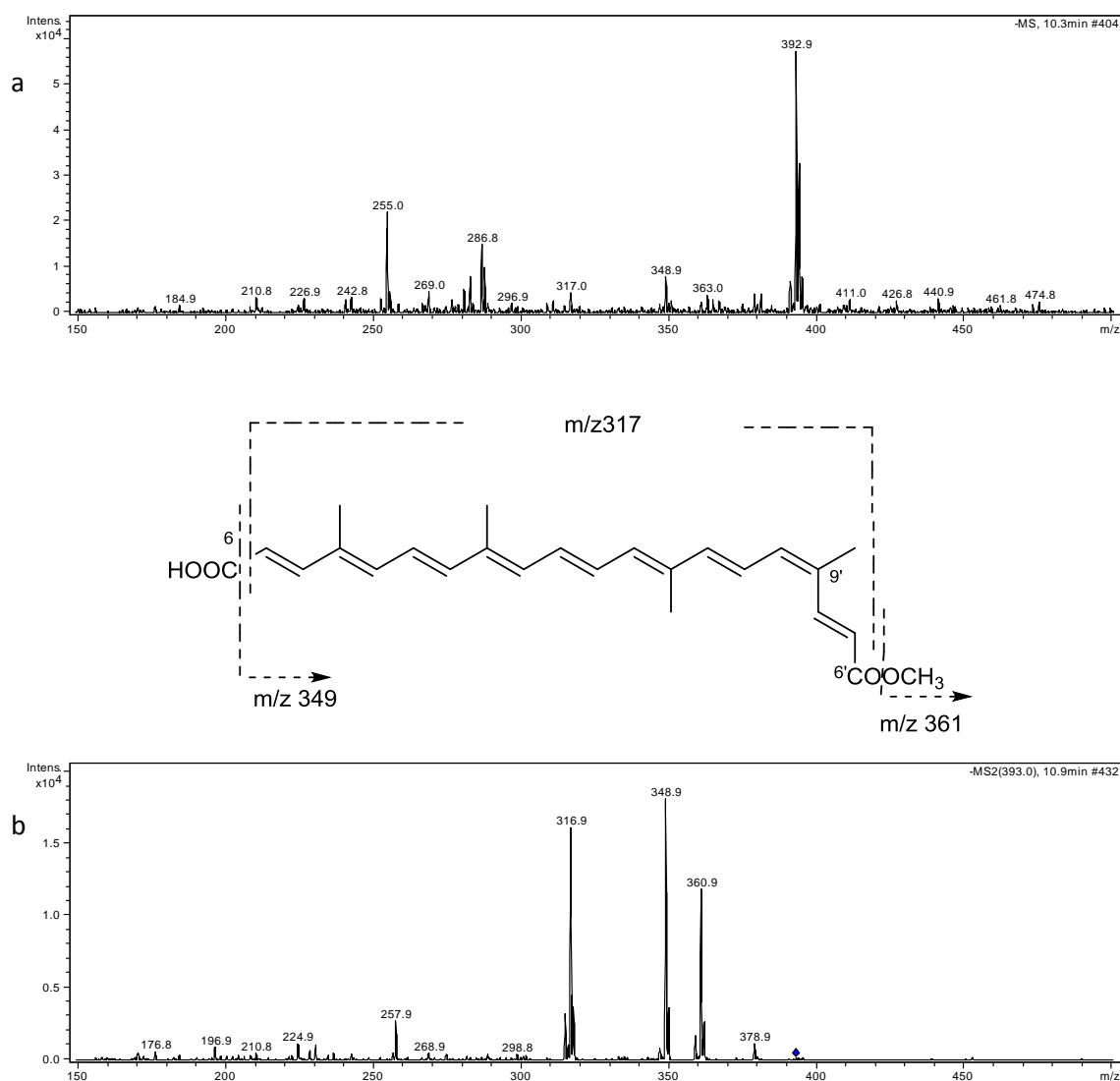


Figura 28. Espectro de masas por APCI modo negativo a = 10.3min; b= 10.9min

5.2.2 Identificación de bixina por RMN- ^1H

Del sólido obtenido por ultrasonido descrito en la sección 5.2 se tomó una pequeña cantidad para el análisis por RMN- ^1H , la muestra se disolvió en CDCl_3 . El espectro obtenido mostró señales acordes a los datos reportados en la literatura (Rehbein, 2007) y (Soumya, 2010) entre otros, para el compuesto bixina $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$

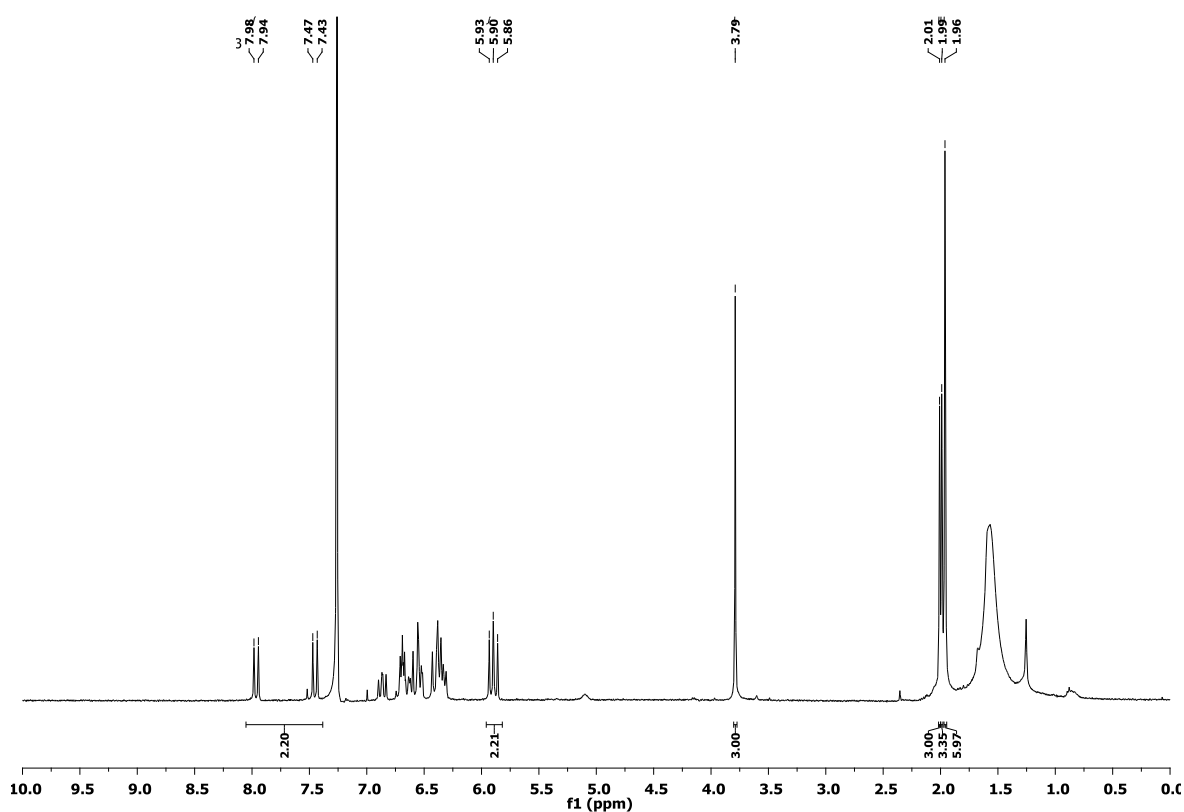


Figura 29. Espectro de RMN- ^1H de bixina aislada

Los siguientes son algunos de los desplazamientos químicos observados 7,71 (dd, 2H, H-8, H-8'), 5,90 (t, 2H H-7, H-7'), 3,79 (s, 3H, COOCH_3), 1,99 (s, 6H, H-20, H-20'). En la región a campo alto (δ 6.3ppm a 7.0ppm) se observa un solapamiento que puede asociarse a presencia de residuos en la muestra aislada e impide asignar las señales correspondientes a los Hidrógenos 10, 10', 11, 11', 12, 12' 14, 14', 15, 15' las cuales se reportan como se observa en la tabla 12 . A partir de los datos de la tabla puede concluirse que el método de extracción y separación de bixina no es selectivo en cuanto a isomería y por tanto el sólido obtenido es una mezcla de ambos isómeros.

Tabla 12. Comparación de desplazamientos químicos entre los dos isómeros de bixina y el compuesto aislado.

ÁTOMO DE H	CIS-BIXINA δ (ppm)	TRANS-BIXINA δ (ppm)	COMPUESTO AISLADO δ (ppm)
7	5.88	5.88	5,90
8	7.35	7.35	7,71
9	-----	-----	-----
10	6.64	6.64	No asignado
11	6.78	6.78	No asignado
12	6.62	6.62	No asignado
13	-----	-----	-----
14	6.47	6.47	No asignado
15	6.83	6.83	No asignado
15'	6.83	6.83	No asignado
14'	6.47	6.47	No asignado
13'	-----	-----	-----
12'	6.53	6.62	No asignado
11'	6.98	6.78	No asignado
10'	6.47	6.64	No asignado
9'	-----	-----	-----
8'	7.94	7.35	7.71
7'	5.92	5.89	5,90

5.3 Resultados de la obtención de compuestos por ultrasonido usando hexano.

En este proceso se obtuvo un extracto de color anaranjado y consistencia oleosa con un porcentaje de recuperación del 2.5%. Si se comparan los porcentajes de rendimiento obtenidos por este método y por el método de FSC es notorio el incremento en rendimiento por la técnica de FSC por lo que se concluye que este método es eficiente para la extracción del extracto oleoso de las semillas de *Bixa orellana*.

El extracto obtenido se separó mediante cromatografía de columna en 2 fracciones la primera incolora, la segunda anaranjada siguiendo las indicaciones descritas en la sección 4.2.2. La fracción 1, fue analizada por CG-EM encontrándose el siguiente cromatograma

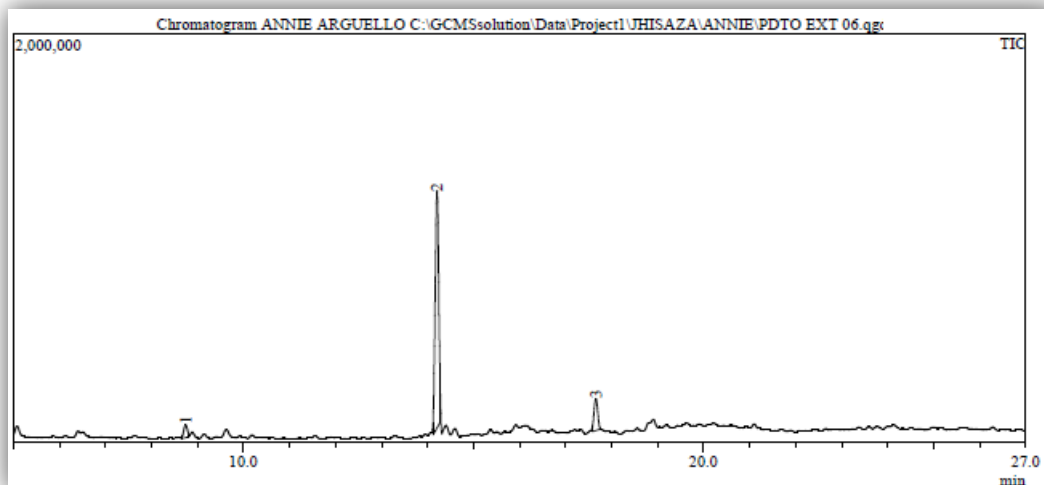


Figura 30. Perfil de CG correspondiente a la fracción 1 del extracto obtenido.

Claramente se observa un pico de mayor abundancia, a un tiempo de retención de 14.2min que haciendo uso de su respectivo espectro de masas (figura 32) y la correlación con los espectros de la base de datos se asigna de forma preliminar como Alloaromadendreno, un sesquiterpeno $C_{15}H_{24}$ identificado en trabajos previos tanto en *Bixa orellana* como en *Bactris gasipaes*, y *Acacallis cyanea* entre muchas otras especies (Galindo, 2002). Su estructura se muestra a continuación:

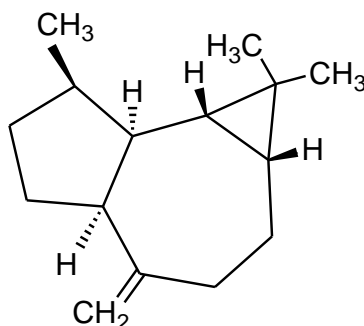


Figura 31. Estructura química del Alloaromadendreno

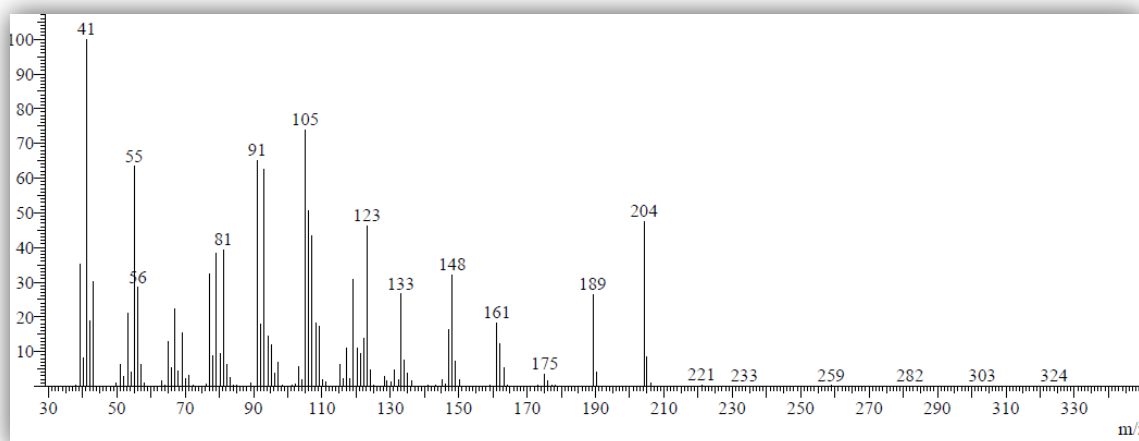


Figura 32. Espectro de masas por IE correspondiente al pico 2

5.4 Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales obtenidos usando el método del DPPH.

La actividad de captura del radical libre DPPH, de los extractos de *Bixa orellana* obtenidos por fluidos supercríticos (M_{FSC}) y por ultrasonido (M_{US}), fue evaluada a diferentes concentraciones, expresadas en ppm y su absorbancia fue medida a 520nm.

Los resultados obtenidos de IC_{50} se muestran en la tabla 13. La dilución a 0 ppm corresponde al blanco que para este experimento fue MeOH. El valor de IC_{50} representa la concentración de extracto que se requiere para una inhibición del 50% de DPPH. Para el caso de los estándares Vit_C y Q_C se obtuvieron valores pequeños lo que indica que se necesita menor concentración de la solución para reducir a la mitad la concentración de DPPH. Para M_{FSC} el valor de IC_{50} fue de $242,29ppm \pm 7,47ppm$, valor que se encuentra bastante alejado del obtenido a partir de los estándares. Esto indica que la capacidad captora de radical libres, en este caso DPPH, del extracto es mucho menor, pero aun así apreciable. La diferencia en la magnitud de los valores puede asociarse a diversos factores: La composición oleosa del extracto, es decir, una mezcla de metabolitos muchos de los cuales no poseen actividad antioxidante y pueden provocar la disminución de la actividad de aquellos compuestos que sí poseen esta propiedad, otro factor que pudo influir

es que se haya usado un factor de dilución muy grande lo que conlleva a una concentración no efectiva de extracto que garantice la actividad captora de los radicales del DPPH.

Tabla 13. Valores de IC₅₀ obtenidos con el método de DPPH para Vit_C, Q_C, M_{FSC} y M_{US}

Muestra	IC ₅₀ (ppm)
Vit _C	5,80 ± 0,61
Q _C	5,34 ± 1.93
M _{FSC}	242,29 ± 7,47
M _{US}	-----

Con relación al extracto M_{US} no se obtuvo un valor de IC₅₀ esto significa que la concentración de extracto necesaria para la inhibición del 50% de DPPH es mayor a 520ppm. Lo que permite deducir que la muestra estaba muy diluida y/o que la composición oleosa del extracto afecta la detección de la actividad antioxidante pues la gran cantidad de metabolitos presentes disminuyen la actividad antioxidante de aquellos metabolitos que si presentan esta propiedad. Por lo anterior se recomienda separar y aislar los metabolitos presentes en el extracto para una posterior determinación de su capacidad antioxidante.

Por último, podría presumirse que el método no es el ideal para medir la actividad antioxidante de los metabolitos presentes en *Bixa orellana*, pues este método se basa en la facilidad de las moléculas presentes en el extracto de liberar iones H⁺ y dado que dentro de los metabolitos presentes en esta especie sobresalen los carotenoides, compuestos que no tienen esta propiedad. Por lo anterior se propone evaluar la actividad antioxidante del extracto por otro método para descartar esta posibilidad.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró evaluar el porcentaje de rendimiento en la extracción del aceite de la semilla de la especie *Bixa orellana* amarilla mediante la técnica de fluidos supercríticos obteniendo un valor de 6.04%.
- ✓ A partir del método de FSC se encontró que el valor más alto de % de rendimiento (6.04%) se da a partir de una presión de extracción 2500psi, temperatura de 40 °C, 3mL de MeOH como co-solvente y usando semilla molida. Esto se sustenta con el análisis de varianza ANOVA.
- ✓ Se detectó la presencia de bixina en el aceite esencial obtenido por FSC mediante la técnica HPLC con la presencia de un pico intenso con tiempo de retención de 9.87min.
- ✓ Se confirmó la presencia en las semillas de *Bixa orellana* de los compuestos *trans*-geranilgeraniol, *cis*-geranilgeraniol, 3,7,11,15-tetrametilhexadeca-1,6,10,11-tetraen-3-ol de tipo diterpeno, y α -Guaieno, Alloaromadendreno de tipo sesquiterpeno, mediante la técnica CG-EM. Los cuales han sido reportados previamente en esta especie.
- ✓ Las técnicas espectroscópicas de RMN-¹H y APCI-EM permitieron la identificación de bixina en las semillas de achiote.
- ✓ El método del DPPH permitió comprobar la actividad antioxidante de uno de los extractos, (M_{FSC}) obteniendo un valor de IC₅₀ de 242,29 ppm \pm 7,47ppm.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGNER A., BAZO A., RIBEIRO L., SALVADORI D.(2005) DNA damage and aberrant crypt foci a putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa-orellana* L.) in rat colon carcinogenesis.En: *Mutat Res.*; 582 (1-2): 146-54.

ARCE, J. (Ed.) (1983) Aspectos sobre el achiote y perspectivas para costa rica. Costa Rica.

BATES, R., SLAGEL, R. C. (1962). "Terpenoids. VI. β -Bulnesene, α -guaiene, β -patchoulene, and guaioxide in essential oils". *Chemistry & Industry*: 1715–1716.

CAMPOS, R., YAMASHITA, F., GOZZO, F., MERCADANTE, A. (2011) Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. En: *Journal of chromatography A*. 1218. 57-63

CHISTÉ, R. C., MERCADANTE, A. Z. (2009). Electrospray Tandem Mass Spectrometry Analysis of natural bixin from annatto sedes. En: *Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas- BrMASS*. 3º Congresso BrMASS Brasil.

CLOCKER COSTA, C. (2007) Estudio fitoquímico de *Bixa orellana* L., bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética. Curitiba,. 115 p: il. Trabajo de grado (Maestría en ciencias farmacéuticas). Universidad federal de Paraná. Facultad de Ciencias de la salud, Departamento de Ciencias Farmacéuticas.

CORDOBA J. (1987) El achiote; cultivo, beneficio y posibilidades de exportación. En: *ESSO Agrícola* 44:1 3-7 Bogotá, Colombia.

DEVIA PINEDA, J.E., SILDARRIAGA CALDERÓN, L. (2003) Planta piloto para obtener el colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). En: *Revista Universidad EAFIT*. 35, 131, 8-22.

FLEISCHER T., AMEADE E., MENSAH M., SAWER I. (2003) Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa-orellana*. En: *Fitoter*, 74 (1-2) p 136-138.

FLORENCE, Bouvier, et al.(2003) Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). En: *Science*. 300, p 2089

GOMEZ, C.H., MACIAS, A. F.(2004) "Extracción del pigmento del achiote con CO₂ supercrítico". Trabajo de grado. Universidad del Valle. Facultad de ciencias. Cali, Colombia.

GONZALES Y., PORTA T., MENDEZ R., BLANCO F. (1989) Estudio de la irritación dérmica primaria en piel dañada de conejos tras la exposición a un extracto alcohólico de *Bixa-orellana* L. En: *Rev. Cubana Estomatol.*; 26

GUTIERREZ M. (2005) “Bixadent”, Nuevo producto natural como revelador de placa dentobacteriana. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. La Habana, Cuba. http://www.memsocbio.sld.cu/habana2005/arrepdf/T078_ Revisado el: noviembre 2013.

HOUSSIAU, L., FELICISSIMO, M., BITTENCOURT, C., PIREAUX, J.J. (2004) TOF-SIMS applied to probe bixin in *Bixa orellana* seeds. En: *Applied Surface Science* 231-232, 416-419.

HUAMÁN, O., ARNAO, I., BÉJAR, E., SANDOVAL, M. (2007) Efecto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Bixa orellana* (achiote), en la secreción gástrica de ratas. En: *Anales de la Facultad de Medicina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 68 (4), 314-320.

IDÁRRAGA, A., ORTIZ, R., CALLEJAS, R., MERELLO, M., (eds.) (2011). Fl. Antioquia 2: 9–939. Universidad de Antioquia, Medellín.

ISAAC, J. O., JONDIKO, G. P. (1989) Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. En: *Phytochemistry*, 28 (11), p 3159-3162.

JÚNIOR A., ASAD L., OLIVEIRA E., KOVARY K., ASAD N., FELZENSZWALB I.(2005) Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. En: *Genet Mol Res*; 4(1) p 94-9.

KIOKIAS, S., GORDON, M. (2003) Antioxidant properties of annatto carotenoides. En: *Food Chemistry*. 83, 523-529.

KIOKIAS, S., OREOPOULOU, V. (2006) Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. En: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 7, 132-139.

KOVARY, K., LOUVAIN, T., COSTA E SILVA, M., ALBANO, F., PIRES, B., LARANJA, G., LAGE, C., FELZENSZWALB, I. (2001) Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. En: *British Journal of Nutrition*. 85, 431-440.

LOURIDO PÉREZ, Hetzel de la C.; MARTÍNEZ SÁNCHEZ, Gregorio. (2010) La *Bixa-orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. En: *Revista Cubana de Farmacia* 44(2) 221-234. La Habana, Cuba.

MAOKA, T. (2009) Recent progress in structural studies of carotenoides in animals and plants. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 483, 191-195.

MARTINEZ, A. (2005) Flavonoides. Facultad de Química Farmaceutica. Medellin, Colombia. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>. revisada en: mayo 2014

MEÑACA OROZCO, Erika V. (2010) Preparación y determinación de la actividad antioxidante de un complejo de inclusión del pigmento de la semilla de achiote (*Bixa orellana* L) y β -ciclodextrina. Trabajo de grado (Químico). Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Cali, Colombia.

MERCADANTE, A.Z. STECK, A. and PFANDER, H. (1997) Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L) seeds. En: *Phytochemistry*. 46, No. 8 , p 1379-1383.

MURCILLO ROJAS, Juan F. (2009) Extracción del colorante del achiote (*Bixa orellana*) con CO₂ supercrítico y el estudio de su poder antioxidante. 71 p: il Trabajo de Grado (Químico). Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Cali, Colombia.

NOBRE, B. P., QUIEROZ, E. M., PESSOA, F. L. P., COELHO, J. P., PALAVRA, A. F., MENDES, R. L., (2002) En: *Chemical Engineering Transactions*, 2, 391.

NORULAINI, N.A.N., SETIANTO, W.B., ZAIDUL, I.S.M., NAWI, A.H., AZIZI, C.Y.M., MOHD OMAR, A.K. (2009) Effects of supercritical carbon dioxide extraction parameters on virgin coconut oil yield and medium-chain triglyceride content. En: *Food Chemistry* 116 (1), 193–197.

PALENZUELA, B., ARCE, L., MACHO, A., MUÑOZ, E., RÍOS, A., VALCÁRCEL, M. (2004) Bioguided extraction of polyphenols from grape pomace by using an alternative supercritical-fluid extraction method based on a liquid solvent trap. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (8), 2021–2027.

RAMAMOORTHY, S., DOSS, F., KUNDU, K., SATYANARAYANA, V., KUMAR, V.(2010) Molecular characterization of bixin-An important industrial product. En: *Industrial Crops and Products*. 32, p 48-53.

REHBEIN, J., DIETRICH, B., GRYNBAUM, M. D., HENTSCHEL, P., HOLTIN, K., KUEHNLE, M., SCHULER, P., BAYER, M., ALBERT, K. (2007) Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. En: *J. Sep. Sci.* 30, 2382-2390.

RODRÍGUEZ L., FRACASSO J., YASHUDA S. (1988) Hypotensive action of the extracts from sedes of *Bixa-orellana* L. En: *Rev Fac. Cienc. Farm.* 10 (1): 41-4.

SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., ABBAS, K. A., NORULAINI, N.A.N., OMAR, A. K. M. (2009) Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review En: *Journal of Food Engineering* 95, 240–253.

SCOTTER, M. (1995) Characterisation of coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. En: *Food Chemistry*. 53, 177-185.

SILVA, G. F., GAMARRA, F., OLIVEIRA, A.L., CABRAL F .A. (2008) Extraction of bixin from annatto seeds using supercritical carbon dioxide. En: *Brazilian Journal of Chemical engineering*. 25 (2), 419-426.

SILVA, R., ALMEIDA, C., CHAVASCO, J. M., CHAVASCO, J. K. (2010) Antimicrobial activity evaluation and MIC determination of lyophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. En: *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20 (2), 171-174.

STEVENS, W., ULLOA, A., MONTIEL, O. (2001). Flora de Nicaragua. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 85: i–xliv.

VALVERDE GARCIA, A., FERNANDEZ-ALBA, A. R., AGÜERA, A., CONTRERAS, M. (1995) Extraction of Methamidophos Residues from Vegetables with Supercritical Fluids Carbon Dioxide. En: *J. AOAC* 78, 867-873.

VONTHORN C., WENIGER B., OUATTARA M., BI F., KAMENAN A., LOBSTEIN A. (2003) In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. En: *J Ethnopharmacol.*; 87(2-3), 221-5.